

**Molekularbiologische Untersuchungen zur subzellulären
Lokalisierung des putativen Transportproteins - P19,5k - des beet
western yellows virus (BWYV) und Erarbeitung der Grundlagen für
eine gentechnisch zu erzeugende Resistenz gegen das BWYV**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Guido Dieterich geb. Laucke

aus Wolfenbüttel

1. Referent: Prof. Dr. Rüdiger Cerff
2. Referent: PD Dr. Eckard Tacke

eingereicht am: 11.05.2000
mündliche Disputation am: 13.10.2000
2000
(Druckjahr)

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

Publikation

Schiemann, J., Laucke, G., Graichen, K., Maiß, E., und Casper, R. 1998. Das Westliche Rübenvergilbungsvirus beim Winterraps - Nachweis, Epidemiologie, Klonierung sowie Ansätze zur züchterischen und gentechnischen Erzeugung von Virusresistenz. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 100 Jahre Pflanzenschutzforschung, Heft 340, Parey Buchverlag Berlin, Seite 35-61

**Meiner Großmutter Carmen in memoriam
und meinem Sohn Tom Jonathan in Liebe**

1 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen für eine Resistenz gegen das Westliche Rübenvergilbungsvirus (BWYV) durch die Herstellung von Virusgen-abgeleiteten Genkonstrukten erarbeitet und die Lokalisierung des vermuteten BWYV Transportproteins P19,5k untersucht.

i. Herstellung und Expression der Virusgenkonstrukte

Drei Hüllproteingen-Konstrukte wurden entwickelt. Im CP-Konstrukt wurde die native BWYV Hüllproteingensequenz unter die Kontrolle des CaMV 35S Promoters und Terminators gebracht. In den beiden abgeleiteten Konstrukten (CP-VPg und NLATCP) wurde die Translation des inneren Leserasters (19,5k-Gen) ausgeschaltet. Die Translation des Hüllproteingens wurde zusätzlich im NLATCP-Genkonstrukt blockiert.

Die Bildung der Hüllproteingen-mRNA konnte für alle drei Konstrukte gezeigt werden. Transgen-kodiertes Hüllprotein konnte in den transgenen Pflanzen nicht nachgewiesen werden.

Das mutmaßliche Transportproteingen des BWYV - das 19,5k-Gen - wurde in zwei Genkonstrukten von dem konstitutiven 35S und dem Phloem-spezifischen RolC Promoter kontrolliert. Zum Nachweis des P19,5k in transgenen Pflanzen wurde ein P19,5k-spezifischer Antikörper hergestellt. Die Bildung der 19,5k-Gen-mRNA und des P19,5k konnte in transgenen Pflanzen nachgewiesen werden.

In den durchgeführten Resistenztests zeigte sich eine große Streuung der Hüllprotein-ELISA-Werte in den BWYV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen. Durch einen zu geringen Stichprobenumfang konnten die erhaltenen Daten nicht statistisch signifikant ausgewertet werden. Lediglich für eine RolC 19,5k-Gen-transgene Linie konnte in mehreren BWYV-Resistenztests ein positiver Trend belegt werden.

ii. Untersuchung der subzellulären Lokalisierung des P19,5k

In einem GFP-Vektor (pCK GFP S65C) wurde die 19,5k-Gensequenz in frame zu dem gfp-Gen kloniert. Das Ergebnis war ein chimäres 19,5k:gfp-Genkonstrukt. Das Fusionsprotein - P19,5k:GFP - wurde eingesetzt, um die subzelluläre Lokalisierung des P19,5k zu bestimmen. Im ersten Schritt wurde die Lokalisierung nach transienter Expression in Tabak-Protoplasten und Blättern untersucht. Punktartige, fluoreszierende Strukturen konnten an der Oberfläche der transformierten Zellen entdeckt werden. Eine Plasmodesmata-Lokalisierung des P19,5k wurde postuliert. Dieses Ergebnis bestätigte sich in stabil transformierten Tabakpflanzen. In 19,5k:gfp-Gen-transgenen Pflanzen zeigte sich die punktartige Fluoreszenz entlang der Zellwände benachbarter Zellen.

Zwei unter den Luteoviren konservierte α -Helix-Domänen (SQWL und DDDEE) innerhalb des P19,5k-N-Terminus wurden mutiert. Im 19,5k:gfp-Genkonstrukt wurden die entsprechenden Kodone durch Alanin-kodierende Kodone verändert. Die Mutation einer der α -Helices (DDDEE) - einer vermutlich amphipathischen α -Helix - führte zu einer Änderung des Fluoreszenzphänotyps. Das mutierte Fusionsprotein (P19,5k DDDEE:GFP) zeigte eine Fluoreszenz innerhalb der Zelle, möglicherweise in oder an Organellen. Offensichtlich wurde ein wichtiges Plasmodesmata-Lokalisierungssignal zerstört.

2 Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Inhaltsverzeichnis	7
3	Abkürzungen	9
4	Einleitung	11
4.1	Das Westliche Rübenvergilbungsvirus (<i>beet western yellows virus</i> ; BWYV) als Krankheitserreger im Raps	11
4.2	Pathogen-vermittelte Resistenz	13
4.2.1	Hüllprotein-vermittelte Resistenz	13
4.2.2	Replikase-vermittelte Resistenz	14
4.2.3	Transportprotein-vermittelte Resistenz	16
4.2.4	RNA-vermittelte Resistenz	16
4.3	Molekulare Beschreibung des BWYV	18
4.4	Ist das P19,5k als Transportprotein in den Plasmodesmata lokalisiert?	20
5	Material und Methoden	23
5.1	Material	23
5.1.1	Chemikalien und Biochemikalien	23
5.1.2	Kits	23
5.1.3	Synthetische Oligonukleotide	23
5.1.4	Plasmide	23
5.1.5	<i>E. coli</i> Bakterienstämme	24
5.1.6	Virus-Isolate	24
5.1.7	Mono- und polyklonale Antikörper, gerichtet gegen das Hüllprotein des BWYV	24
5.1.8	Standardlösungen und Medien	24
5.2	Allgemeine Methoden	24
5.2.1	Sterilisationsverfahren	24
5.2.2	Phenolisierung von Nukleinsäuren	25
5.2.3	Nukleinsäurefällung mit Ethanol oder Isopropanol	25
5.2.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren	25
5.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	25
5.2.6	Kultivierung von Bakterien	25
5.3	Klonierung von DNA in <i>E. coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
5.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	26
5.3.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	26
5.3.3	Amplifikzierung von DNA-Sequenzen mit Hilfe der PCR	26
5.3.4	Mutagene Megaprime-PCR	26
5.3.5	Isolierung von DNA aus präparativen Agarose-Gelen	27
5.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten	28
5.3.7	<i>In vitro</i> -Mutagenese	28
5.3.8	Sequenzierung von dsDNA mit T7-Polymerase	29
5.3.9	Elektrophorese von radioaktiv markierten DNA-Strängen	30
5.3.10	Herstellung von elektrokompenten Bakterien und Transformation	30
5.3.11	Analytische Plasmid-Isolierung aus Bakterien	31
5.3.12	Maxipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	32
5.4	Gewinnung von Nukleinsäuren aus pflanzlichem Gewebe	32
5.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe	32
5.4.2	Isolierung von genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe	32
5.5	Hybridisierungsanalyse von Nukleinsäuren	32
5.5.1	Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden	32

5.5.2	Southern-Blot und Hybridisierung pflanzlicher genomischer DNA	33
5.5.3	Northern-Blot und Hybridisierung pflanzlicher RNA	34
5.6	Analyse von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern	35
5.6.1	Präparation von pflanzlichen Proteinen	35
5.6.2	ELISA zum Virusnachweis	35
5.6.3	Subzelluläre Fraktionierung	36
5.6.4	Isolierung des P19,5k-Antigens	36
5.6.5	Herstellung von polyklonalen Antikörpern	37
5.6.6	<i>Dot blot</i> -Test	37
5.6.7	Western-Blot-Analyse	38
5.7	Analyse von Markergenen (nptII, gus)	40
5.7.1	Segregationsanalyse des nptII-Gens	40
5.7.2	GUS-Test	40
5.7.3	Detektion des GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie	40
5.7.4	Detektion des GFP mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie (CLSM)	41
5.8	Transformation von Pflanzen	41
5.8.1	Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> und <i>Nicotiana tabacum</i>	41
5.8.2	Transformation mit der Partikelkanone	42
5.8.3	Isolierung und Regeneration von Protoplasten	42
6	Ergebnisse	44
6.1	Hüllproteingen-Klonierungsstrategie für das pflanzliche Transformationssystem	44
6.2	Nachweis der Expression der Hüllproteingen-Konstrukte	47
6.3	19,5k-Gen-Klonierungsstrategie für das pflanzliche Transformationssystem	53
6.4	Nachweis der Expression der 19,5k-Genkonstrukte	56
6.5	Versuche zur Virusgen-vermittelten Virus-Resistenz	65
6.6	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung des P19,5k	69
6.6.1	19,5k:GFP-Gen-Klonierungsstrategie für die subzelluläre Lokalisierung des P19,5k in Pflanzenzellen	69
6.6.2	Lokalisierung der P19,5k:GFP-Fusionsproteine nach transienter Expression in Pflanzenzellen	72
6.6.3	Lokalisierung des P19,5k:GFP-Fusionsproteins in stabil transformierten Pflanzen	77
7	Diskussion	84
7.1	Nachweis und Expression der Hüllprotein- und 19,5k-Genkonstrukte in transgenen <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen	84
7.2	BWYV-Resistenztest in <i>N. benthamiana</i>	85
7.3	Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung des GFP nach Fusion mit dem P19,5k	86
8	Literatur	92
9	Anhang	100
9.1	Sequenz der Expressionskassette CP	100
9.2	Sequenz der Expressionskassette CP-VPg	101
9.3	Sequenz der Expressionskassette NLATCP	102
9.4	Sequenz der Expressionskassette 19,5k-Gen	103
10	Danksagung	105

3 Abkürzungen

2,4 D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
A	Ampère
A	Adenin
A	Alanin
α	alpha
A. tumefaciens	Agrobacterium tumefaciens
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
AIMV	Luzernemosaik-Virus (alfalfa mosaic virus)
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
BAP	Benzylaminopurin
B. napus	Brassica napus
BNYVV	Rizomania- oder Rübenwurzelbärtigkeitsvirus (beet necrotic yellow vein virus)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BMV	Mildes Rübenvergilbungsvirus (beet mild yellowing virus)
BWV	Westliches Rübenvergilbungsvirus (beet western yellows virus)
BYDV	Gerstengelbverzwergungsvirus (barley yellow dwarf virus)
°C	Grad Celsius
C	Cystein
ca.	circa
CaMV	Blumenkohl Mosaik-Virus (cauliflower mosaic virus)
cDNA	komplementäre DNA
CLSM	konfokale Laserscanningmikroskopie
CMV	Gurken Mosaik-Virus (cucumber mosaic virus)
CP	Hüllprotein (coat protein)
CTP	Cytidintriphosphat
D	Asparaginsäure
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dsDNA	Doppelstrang-DNA (double stranded DNA)
E	Glutaminsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde (hour)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Leucin
I	Liter
LB	left border
M	molar

mA	Milliampère
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
NAA	1-Naphthylethylsäure
NPTII	Neomycinphosphotransferase II
OD	Optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05% (v/v) Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pfu	plaque forming unit
PLRV	Kartoffelblattroll-Virus (potato leafroll virus)
PAA	Polyacrylamid
PPV	Scharka-Virus (plum pox virus)
PVX	Kartoffelvirus X (potato virus X)
PVY	Kartoffelvirus Y (potato virus Y)
Q	Glutamin
RB	right border
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
ssDNA	Einzelstrang-DNA (single stranded DNA)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	Tabakätz-Virus (tobacco etch virus)
TMV	Tabak Mosaik-Virus (tobacco mosaic virus)
U	Einheiten (units)
u. a.	unter anderem
ü/N	über Nacht (ca. 16 Stunden)
UpM	Umdrehung pro Minute
V	Volt
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen/Volumen
W	Tryptophan
(w/v)	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
xg	xfache Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
ZYMV	Zucchini Gelbmosaik-Virus (zucchini yellow mosaic virus)

4 Einleitung

4.1 Das Westliche Rübenvergilbungsvirus (beet western yellows virus; BWYV) als Krankheitserreger im Raps

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Einsatzmöglichkeiten nachwachsender Rohstoffe in der Industrie mit umweltverbessernder Wirkung aufgezeigt (Raps-Kultur mit Perspektive, 1996, BASF). Bei der Verwendung von Ölsaaten als nachwachsender Rohstoff haben sich drei Schwerpunkte entwickelt:

- Raps als Motorentreibstoff
- Raps- und Sonnenblumenöl in der Oleochemie (Erucasäure-haltiger Raps und 00-Raps sowie High-Oleic-Sonnenblumen)
- Rapsöl als Rohstoff für Hydrauliköle, Schmierstoffe, Emulsionen und Lösungsmittel.

Unter den Ölsaaten ist Raps eine der ertragreichsten Pflanzen. Die Samen enthalten bis zu 40% Rapsöl. Er ist durch Kreuzung zwischen Wildformen des Rübsens (*Brassica rapa*) und des Gemüsekohls (*Brassica oleracea*) entstanden.

Raps erlangt aufgrund der durch Züchtung und Gentechnik relativ leicht zu verändernden Fettsäurezusammensetzung innerhalb der nachwachsenden Rohstoffe eine immer größere Bedeutung. Eine industrienähe landwirtschaftliche Rapsölproduktion verlangt sichere Erträge und hohe Rentabilität. Sichergestellt werden kann dieses nur durch die Verwendung gesunder beziehungsweise krankheitsresistenter Pflanzen. Zahlreiche Pilze und Insekten-schädlinge bedrohen diese Vorgaben (Lühs und Friedt, 1997). Die größten Schäden im Rapsanbau verursacht z. B. der Pilz *Phoma lingam*, der Erreger der Wurzel- und Stengelfäule. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren hochgradige Infektionsraten durch das blattlausübertragbare Westliche Rübenvergilbungsvirus (BWYV) festgestellt (Graichen, 1991; 1997; Schröder, 1994). Bild 1 zeigt die Vergilbung eines Rapsblattes nach BWYV-Infektion.

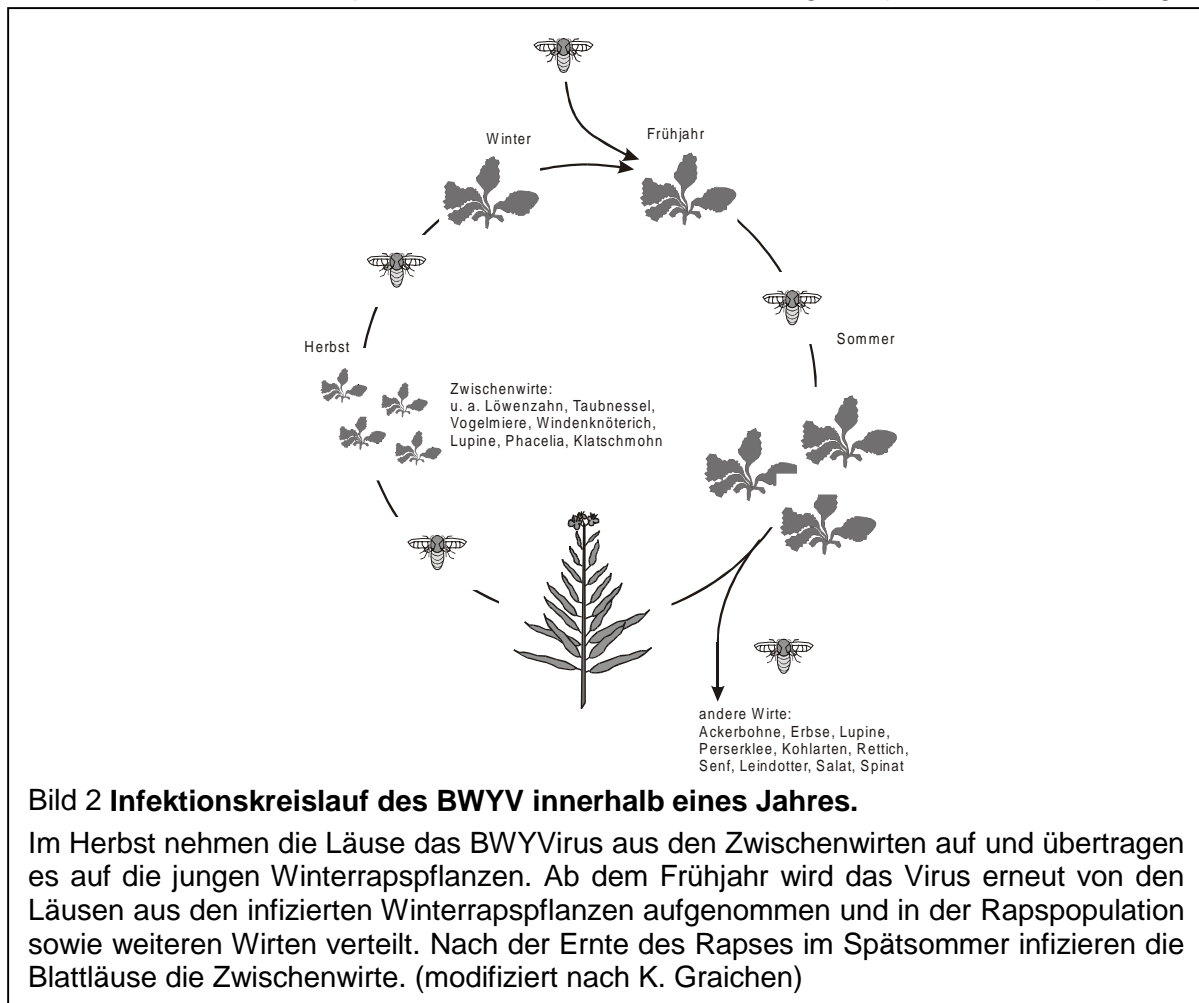
Das BWYV verfügt über einen großen Wirtskreis unter den Kultur-, Unkraut- und Wildarten, wodurch ein geschlossener Infektionskreislauf gewährleistet wird (Bild 2; Schiemann et al., 1998). Die jungen Winterrapspflanzen werden gegen Ende der Vegetationszeit durch virustragende Blattläuse infiziert. Im Frühjahr können Blattläuse erneut das BWYV



Bild 1 Vergilbung eines Rapsblattes nach BWYV-Infektion.

Mit Fortschreiten der Krankheit nimmt auch die Gelbfärbung der Blätter zu. Ältere infizierte Blätter werden dicker, welliger und fast komplett gelb, mit Ausnahme von grünen Bezirken in der Nähe der Adern. Infizierte Blätter werden häufig durch *Alternaria* sp. befallen, welche Läsionen erzeugen. (Quelle: <http://users.cwnet.com/hollylab/y2.htm>)

aufnehmen und es schnell in der Pflanzenpopulation ausbreiten. So können an manchen Standorten bis zu 100% der Rapspflanzen infiziert werden (Graichen, 1997; Schiemann et al., 1998). Der Virusbefall äußert sich in einer Samen- und Ölertragsminderung von mehr als 25%, zusätzlich zeigen infizierte Pflanzen Vergilbungen und Anthozyanverfärbungen (Schröder, 1994; Graichen, 1997; Graichen et al., 1997; Schiemann et al., 1998). Die Schadwirkungen des BWYV lassen sich nicht immer auf Virusbefall zurückführen, da die Symptome auch durch Nährstoffmangel und andere abiotische Faktoren hervorgerufen werden können (Graichen, 1991, 1997; Schiemann et al., 1998). Eine Fehlinterpretation führt in der Folge beim Landwirt zu unnötigen, kostenintensiven Gegenmaßnahmen, z. B. zusätzlicher Stickstoffdüngung. Eine Maßnahme zur Verhinderung der BWYV-Infektion in den Rapsbeständen wäre der Einsatz von Insektiziden zur Bekämpfung der Blattläuse. Diese Art der Kontrolle wäre teuer, schädlich für die Umwelt und nicht vollständig wirksam (Graichen, 1997; zitiert u.a. Read et al., 1988; Walsh et al., 1989). Da die aktuellen Winterrapssorten eine hohe BWYV-Anfälligkeit (Graichen, 1997) zeigen,



müssen Maßnahmen getroffen werden, um die oben genannten Forderungen der industrienahen Landwirtschaft zu erfüllen. Ein Resyntheseraps zeigte bei Untersuchungen von K. Graichen nach Rückkreuzungen mit Kulturformen BWYV-resistente Nachkommen. Die gefundenen Spaltungsverhältnisse lassen nicht auf einen einfachen monogenen Erbgang schließen (Graichen, 1997). Resistenzen, deren Ausprägung durch mehrere Gene kontrolliert werden, gestalten sich aber in der Züchtung schwierig. Da also keine verwertbaren Quellen natürlicher BWYV-Resistenzen verfügbar sind, bietet sich eine gentechnische Lösung an. Die Transformation von Raps mit viralen Genen stellt eine attraktive Alternative dar, um eine Resistenz gegen BWYV zu erhalten (Schiemann et al., 1998). Der folgende Abschnitt soll die derzeitigen gentechnischen Möglichkeiten zur Erzeugung einer Virusresistenz in Pflanzen beleuchten.

4.2 Pathogen-vermittelte Resistenz

Das erste Beispiel für gentechnisch erzeugte Virusresistenz in Pflanzen wurde 1986 veröffentlicht (Powell-Abel et al., 1986). TMV-Hüllproteingen-transgene Pflanzen waren resistenter gegen eine TMV-Infektion als nicht-transgene Kontrollpflanzen. Dieses Resistenzphänomen nannte man „Hüllprotein-vermittelte“ Resistenz. Nach dieser eindrucksvollen Demonstration wurden bald weitere Hüllprotein-vermittelte Resistenzen in transgenen Pflanzen bekannt. Später wurde erkannt, daß auch andere Nukleotidsequenzen von Pflanzenviren in transgenen Pflanzen Resistenz vermitteln können. Verwendbar sind Sequenzen des Replikationsapparates oder Sequenzen, welche für defekte virale Proteine kodieren. Das Transgen stört möglicherweise bei der Initiation der Infektion, beeinflusst die Replikation des Virus, die Verbreitung der Infektion in der Pflanze oder vermindert die Symptomausprägung. Dabei können mehrere dieser Prozesse von nur einem Transgen verursacht werden.

Die Resistenz kann zwischen „sehr gering“ und „sehr hoch“ schwanken. Sie kann ausschließlich auf sehr engverwandte Virusstämme beschränkt sein – und dann sehr hoch, oder auf nicht engverwandte Viren – und dann meist schwächer. Einen umfassenden molekularen Mechanismus für das Phänomen der Pathogen-vermittelten Resistenz konnte man noch nicht beschreiben. Bewährt sich eine Virussequenz in einem Virus-Wirt-System, so kann eine analoge Virussequenz in einem anderen Virus-Wirt-System ineffektiv bleiben.

Verschiedene Resistenzphänotypen konnten gefunden werden. Diese sind vermutlich Ausdruck unterschiedlicher zellulärer und molekularer Mechanismen, die in transgenen Wirtspflanzen verwirklicht werden können, wenn die Virusgen-mRNA oder die exprimierten Virusproteine mit einem eindringenden Virus interagieren (Beachy, 1993). Folgende Resistenzphänotypen werden beschrieben:

- i. Zeitlich verzögerte Symptomentwicklung (z. B. Loesch-Fries et al., 1987)
- ii. Abschwächung der normalen Virussymptome (z. B. Nelson et al., 1987)
- iii. Verzögerung oder völliges Fehlen systemischer Viruserkrankungen (z. B. Tumer et al., 1987)
- iv. recovery-Phänotyp (einige Zeit nach der Infektion nehmen die systemischen Symptome in sich neu entwickelnden Blättern ab oder verschwinden, z. B. Lindbo und Dougherty, 1992)
- v. Verringerte Virusvermehrung (z. B. Hemenway et al., 1988)
- vi. Immunität (z. B. Fang und Grumet, 1993)

4.2.1 Hüllprotein-vermittelte Resistenz

Die Hüllprotein-vermittelte Resistenz ist die am häufigsten verwendete Strategie zur gentechnischen Erzeugung einer Virusresistenz. Im Falle des alfalfa mosaic virus (AIMV) war in Hüllprotein-akkumulierenden, transgenen Wirtspflanzen, wie z. B. der Tomate oder dem Tabak, die Reduktion der Symptome in den inokulierten Blättern beobachtet worden; nachfolgende Blätter zeigten geringere oder gar keine Symptome. Der Grad der Resistenz nahm mit ansteigender Konzentration des Virus im Inokulum ab (Loesch-Fries et al., 1987). Die Tabelle 1 gibt einen kurzen, unvollständigen Überblick über Anwendungen dieser Strategie.

Folgende Mechanismen der Hüllprotein-vermittelten Resistenz wurden vorgeschlagen (Fitch und Beachy, 1993; Wilson, 1993):

- i. Verhinderung des Abstreifens der Hülle (uncoating) eines in die Zelle eintretenden Virus
- ii. Wechselwirkungen mit der viralen Translation und/oder Replikation
- iii. Eingriffe in den Zell-zu-Zell- und/oder Langstreckentransport.

Bei Potyviren (Lindbo et al., 1993b) und bei Luteoviren (Kawchuk et al., 1990) war der Grad der Resistenz unabhängig von der Expressionshöhe des Hüllproteins. Die mRNA des Transgens könnte hier - neben anderen Möglichkeiten - für die Resistenz verantwortlich sein (RNA-vermittelte Resistenz). Diese RNA-vermittelte Resistenz ist in manchen Fällen ebenso wirksam wie die Expression der Hüllproteine in transgenen Pflanzen, in anderen jedoch weniger effektiv (Fitch und Beachy, 1993).

Tabelle 1 Überblick über Hüllproteingen-vermittelte Resistenz

Virusgruppe	Wirtspflanze	Erfolg	Literatur
Luzerne Mosaik-Viren			
AIMV	Tabak	Resistenz gegen AMV; mutiertes Hüllprotein vermittelt keine Resistenz	Loesch-Fries et al., 1987 Tumer et al., 1987
AIMV	Tomate	Resistenz gegen AMV	Tumer et al., 1987
Furoviren			
BNYVV	Zuckerrübe	Resistenz gegen BNYVV	Kallerhoff et al., 1990
Luteoviren			
PLRV	Kartoffel	Resistenz gegen PLRV	Kawchuk et al., 1990, 1991
PLRV	Tabak	Virusvermehrung gehemmt	Barker et al., 1993
PLRV	Kartoffel	Wirtsresistenzgen und PLRV- Hüllprotein vermittelte Resistenz haben additive Wirkung; keine vollständige Resistenz gegen PLRV; Resistenz durch PLRV- Hüllprotein verleiht (wie die natürliche Resistenz) keine Immunität, sondern reduziert den Virustiter nur	Barker et al., 1994a, b
Cucumovirus			
CMV-C	Tabak	Resistenz gegen CMV-C	Cuozzo et al., 1988
Potexvirus			
PVX	Tabak	Resistenz gegen PVX	Hemenway et al., 1988
Potyviren			
PVY	Kartoffel	Resistenz gegen PVY	Lawson et al., 1990
ZYMV	Melone	full length-Hüllprotein: vermittelt hohe Resistenz; verkürztes Hüllprotein: Symptomverzögerung um einige Tage	Fang und Grumet, 1993
TEV	Tabak	verkürztes Hüllprotein vermittelt auch Resistenz; Phänotyp der transgenen Linien nicht einheitlich, recovery-Phänotyp häufig	Lindbo und Dougherty, 1992
Tobamovirus			
TMV	Tabak	Resistenz gegen TMV und andere Tobamoviren	Powell-Abel et al., 1986
TMV	Tabak	verkürztes Hüllprotein verursacht Nekrose	Culver und Dawson, 1991
TMV	Tomate	Resistenz gegen TMV	Nelson et al., 1987, 1988

4.2.2 Replikase-vermittelte Resistenz

Die Verwendung mutierter, verkürzter und - unter Umständen - auch von Wildtyp-Replikase-genen in transgenen Pflanzen vermittelt ein hohes Resistenzniveau, das auch bei Inokulation mit hohen Virustitern wirksam ist. Der Schutz ist in der Regel sehr eng auf homologe bzw. sehr nah verwandte Viren begrenzt (Golemboski et al., 1990).

Baulcombe postulierte 1996, daß bei den meisten erfolgreichen Anwendungen dieser Replikasegen-Strategie die Resistenz RNA-vermittelt und homologieabhängig sei. In der Veröffentlichung einer Replikase-vermittelten Resistenz gegen PVY von Audy et al. (1994)

und AIMV von Brederode et al. (1995) wurde dagegen diskutiert, daß der Resistenzmechanismus Protein-vermittelt und nicht RNA-vermittelt sei.

Die Wirkung mutierter Replikasen oder Replikasefragmente wird durch Assoziation der transgenen, fehlerhaften Replikasemoleküle mit viralen Replikasen oder anderen viralen bzw. wirtskodierten Proteinen zu funktionsuntüchtigen Replikasekomplexen erreicht, die die Virusproteinsynthese verhindern (Audy et al., 1994; Brederode et al., 1995). Alternative Möglichkeiten sind das gene silencing (Mueller et al., 1995) oder beide Mechanismen zusammen (Carr und Zaitlin, 1991). Die Tabelle 2 gibt einen kurzen, unvollständigen Überblick über Anwendungen dieser Strategie.

Virusresistente transgene Kartoffeln oder Hafer, welche das Replikasegen exprimieren, sind Beispiele für die Anwendung dieser Strategie bei Luteoviren (Kaniewski et al., 1994; Koev et al., 1996).

Tabelle 2 Überblick über Replikasegen-vermittelte Resistenz

Virusgruppe	Wirtspflanze	Transgen	Erfolg	Literatur
Luzerne Mosaik-Viren				
AIMV	Tabak	P2, C-Terminus P2, GDD-Motiv zu VDD mutiert P2, GDD-Motiv zu GGD, GVD oder DDD mutiert	keine Resistenz keine Resistenz hohe Resistenz gegen AMV-Infektion	Brederode et al., 1995
Potexvirus				
PVX	Tabak	ORF1 ORF1, N-Terminus ORF1, GDD-Motiv mutiert ORF1, nicht-translatierbar	Resistenz gegen PVX-Infektion Resistenz gegen PVX in manchen Fällen Resistenz gegen PVX, in manchen keine Resistenz gegen PVX	Braun und Hemenway, 1992 Braun und Hemenway, 1992 Longstaff et al., 1993 Mueller et al., 1995
Potyviren				
PVY-O	Tabak	Nib Nib, C-Terminus Nib, C-Terminus Nib, GDD-Motiv mutiert	Resistenz gegen PVY-O, keine gegen PVY-N Resistenz gegen PVY-O Resistenz gegen PVY-O keine Resistenz	Audy et al., 1994
Tobamovirus				
TMV	Tabak	54 kDa-Protein ORF1 durch Insertion verkürztes ORF1-Protein	hohe Resistenz gegen TMV keine Resistenz gegen TMV Resistenz gegen TMV und andere Tobamoviren	Golemboski et al., 1990 Donson et al., 1993

4.2.3 Transportprotein-vermittelte Resistenz

Die Bildung eines dysfunktionalen oder nur teilweise aktiven Transportproteins in transgenen Pflanzen ist vermutlich für die Resistenz gegen das Virus verantwortlich. Transgen-exprimierte, defekte Transportproteine könnten die Interaktion des viralen Transportproteins mit Wirtsfaktoren oder der viralen Nukleinsäure stören.

Tabelle 3 Überblick über Transportproteingen-vermittelte Resistenz

Virusgruppe	Wirtspflanze	Transgen	Erfolg	Literatur
Luteoviren				
PLRV	Kartoffel	mutiertes Transportprotein	Schutz gegen PLRV, PVX und PVY	Tacke et al., 1996
Tobamovirus				
TMV	Tabak	30 kDa Transportprotein mutiert	weniger und kleinere Läsionen nach Infektion mit TMV-RNA	Lapidot et al., 1993
		30 kDa Transportprotein, full length	beschleunigte Symptomentwicklung, verstärkte Symptome	Cooper et al., 1995

Die erzeugte Resistenz durch die transgene Expression eines dysfunktionalen TMV-Transportproteins ist wahrscheinlich die Folge der Konkurrenz um Plasmodesmata-Bindungsstellen zwischen dem mutierten Transportprotein und dem Transportprotein des inokulierten Virus (Lapidot et al., 1993). Eine interessante und möglicherweise nützliche Eigenschaft dieser Transportprotein-vermittelten Resistenz ist das breite Spektrum der Wirksamkeit des Resistenzmechanismus. Die erzeugte Resistenz durch das mutierte Transportprotein von TMV zum Beispiel vermittelt Resistenz gegen Viren der Potex-, Cucumo- und Tobravirgruppe - zusätzlich zu der gegen Tobamoviren (Cooper et al., 1995). Die Tabelle 3 gibt einen kurzen, unvollständigen Überblick über Anwendungen dieser Strategie. Tacke et al., (1996) publizierten ihre Ergebnisse zur Erzeugung von Resistenz gegen das PLRV in der Kartoffel durch die Expression des Transportproteingens (17k-Gen). Linien, die ein N- oder C-terminal verlängertes PLRV P17k bildeten, waren gegen eine Infektion mit zwei nicht-verwandten Kartoffelviren, PVX und PVY, resistent. Die PLRV-Resistenz der 17k-Gen-exprimierenden Kartoffelpflanzen scheint mRNA-vermittelt, die Breitbandresistenz Protein-vermittelt.

4.2.4 RNA-vermittelte Resistenz

In den oben beschriebenen Beispielen wurde die Resistenz meist durch Proteine erzeugt, die vom Transgen kodiert werden. In anderen Beispielen der Pathogen-abgeleiteten Resistenz erfolgte eine direkte Hemmung des viralen Infektionszyklus durch das Transgen selbst oder sein RNA-Transkript, denn häufig fehlt eine Korrelation zwischen dem Expressionsniveau des transgenen Proteins und dem Grad der Resistenz. In einigen Fällen konnte sogar kein Proteinprodukt nachgewiesen werden (Kawchuk et al., 1991). Bei der Konzeption der antisense-Hüllproteingen-Klonierungen wird von einem Modell ausgegangen, daß in transgenen Pflanzen, welche eine zur viralen RNA spiegelbildliche mRNA-Kopie exprimieren, die Replikation des Virus gestört wird, indem sich die Kopien mit der entsprechenden viralen RNA paaren und einen RNA-Doppelstrang bilden (Fitch und Beachy, 1993). Die Tabelle 4 gibt einen kurzen, unvollständigen Überblick über Anwendungen dieser Strategie.

Tabelle 4 Überblick über antisense-Hüllproteingen-vermittelte Resistenz

Virusgruppe	Wirtspflanze	Erfolg	Literatur
Luteoviren			
PLRV	Kartoffel	gesteigerte Resistenz, ähnlich der sense-Hüllprotein-vermittelten Resistenz	Kawchuk et al., 1991
PLRV	Kartoffel	gesteigerte Resistenz, ähnlich der sense-Hüllprotein-vermittelten Resistenz	Barker et al., 1993
Cucumovirus			
CMV	Tabak	Krankheitssymptome nur leicht abgeschwächt	Cuozzo et al., 1988
Potexvirus			
PVX	Tabak	schwache Resistenz, nur bei sehr niedrigem Infektionsdruck	Hemenway et al., 1988
Potyviren			
PVY	Tabak	keine Resistenz	Smith et al., 1994
PVY	Kartoffel	Resistenz gegen PVY ähnlich wie bei sense-Hüllproteingen	Sokolova et al., 1995
TEV	Tabak	Resistenz stärker als bei sense-Hüllproteingen	Lindbo und Dougherty, 1992
Tobamovirus			
TMV	Tabak	keine Resistenz	Powell et al., 1989

Während einer Tagung unter dem Titel „Luteoviruses“ in Cirencester (Großbritannien) vom 24. bis 26. März 1997 herrschte Einigkeit darüber, daß alle beschriebenen Luteovirus-resistenzen RNA-vermittelt seien (siehe auch Barker et al., 1993). Barker berichtete, daß transgene Kartoffelpflanzen mit dem meisten Hüllproteingen-Transkript den niedrigsten Virustiter nach PLRV-Infektion zeigten.

In antisense- und sense-Orientierung klonierte PLRV-Hüllproteingene vermitteln das gleiche Resistenzniveau. Wahrscheinlich können in beiden Fällen die Transkripte des Transgens mit der Virusreplikation interferieren, indem sie mit komplementären viralen Sequenzen interagieren (Kawchuk et al., 1991; Tabelle 4).

Zur Theorie der sense-Suppression führten Untersuchungen an transgenen tobacco etch potyvirus (TEV)-Hüllproteingen-transgenen Pflanzen, die einen recovery-Phänotyp zeigten (Lindbo et al., 1993a). Obwohl das Transgen noch transkribiert wurde, war seine mRNA-Konzentration nach Infektion mit dem korrespondierenden Virus reduziert. Der Regulationsmechanismus soll auf einer Wechselbeziehung zwischen der mRNA des Transgens, viraler RNA und dem Wirtsgenom beruhen. Danach aktiviert die transgene mRNA ein im Zytoplasma lokalisiertes pflanzeigenes System, durch das spezifisch RNA-Sequenzen erkannt und abgebaut werden (Lindbo et al., 1993a; Dougherty et al., 1994; Smith et al., 1994). Dieses System soll erst oberhalb eines bisher undefinierten, für die jeweilige mRNA spezifischen Schwellenwertes aktiviert werden. Bei transgenen Pflanzen mit dem recovery-Phänotyp soll ein solcher Schwellenwert erst nach der Infektion mit dem korrespondierenden Virus und der Replikation der viralen RNA erreicht werden. Es wurde vorgeschlagen, daß sequenzspezifische RNA-bindende Produkte an die über den Schwellenwert gebildete RNA binden und so den Abbauweg einleiten. Eine andere Möglichkeit wäre, daß RNA-abhängige RNA-Polymerasen kurze Antisense-Transkripte zu den überschüssigen RNAs synthetisieren. Durch Hybridisierung der viralen RNA mit diesen Transkripten würde der Abbau eingeleitet werden (Lindbo et al., 1993b; Dougherty et al., 1994).

Nachdem hier ein Überblick über den heutigen Stand der Pathogen-vermittelten Resistenz gegeben wurde und gezeigt worden ist, welche Virusgene im Prinzip verwendet werden könnten, soll im folgenden aufgeführt werden, welche entsprechenden BWYV-Gene bekannt sind.

4.3 Molekulare Beschreibung des BWYV

Das BWYV gehört zu den Poleroviren innerhalb der Familie der Luteoviridae, welche früher unter dem Namen Luteoviren zusammengefaßt wurden. Eines der bekanntesten Luteoviren ist das Kartoffelblattroll-Virus (PLRV; Namensgeber des Genus Polerovirus), welches weltweit enorme Ernteausfälle verursacht (Rochow und Duffus, 1981).

Luteoviren sind in ihrer Wirtspflanze generell auf das Phloem begrenzt und werden durch Blattläuse fortdauernd (persistent) übertragen, ohne in ihnen zu replizieren (Eskandari et al., 1979). Im Gegensatz zu den meisten anderen Luteoviren besitzt das BWYV einen großen Wirtspflanzenkreis, zu dem auch Wildkräuter gehören, welche ein Reservoir für Infektionen darstellen (Bild 2). Früher wurde angenommen, daß es sich bei den Viren BWYV und BMYV (Mildes Rübenvergilbungsvirus) um Isolate desselben Virus handelt. Graichen konnte dies in seinen Studien eindeutig widerlegen (Graichen, 1991). BMYV-Isolate konnten nicht auf Winterrapspflanzen übertragen werden. Umgekehrt infiziert BWYV keine Zuckerrüben (Tabelle 5).

Tabelle 5 **Vergleich des Wirtspflanzenkreises zwischen BWYV und BMYV.**

Raps läßt sich mit BWYV infizieren, aber nicht mit BMYV. +: Infektion, -: keine Infektion (Quelle: Graichen, 1991)

PFLANZENART	VIRUS	
	BWYV	BMYV
Raps	+	-
Senf	+	+
Spinat	+	+
Salat	+	-
Zuckerrübe	-	+

Luteoviren sind von allen bekannten Pflanzenviren die weitaus kleinsten. Die isometrischen Partikel (Bild 3) haben eine Größe von 24 bis 27 nm (Casper, 1988). Das Genom ist durch eine einzelsträngige (+)-RNA von durchschnittlich 5,8 kb Länge charakterisiert. Kovalent mit der RNA verbunden ist ein kleines Protein von ca. 7 kDa Größe: das VPg (virus protein genome-linked). Das 3'-Ende der RNA ist nicht polyadenyliert und besitzt keine tRNA-ähnliche Struktur. Die Gene des 5'-Terminus (ORF0, ORF1 und ORF2) sind hoch divergent unter den Luteoviridae. Diese Gruppe wird durch eine nicht-translatierte Region von ca.

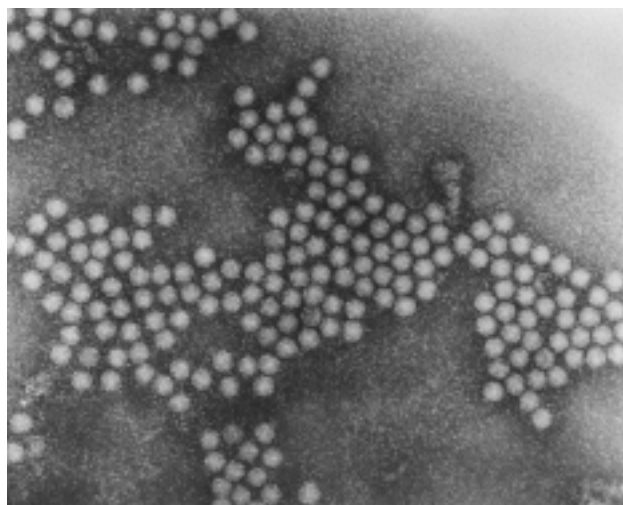


Bild 3 **Elektronenmikroskopische Aufnahme von BWYV-Partikeln.**

Die isometrischen Partikel haben eine Größe von 24 bis 27 nm. (Quelle: Lesemann, BBA/Institut PS)

200 Nukleotiden - fast in der Mitte des Genoms - von einer Einheit dreier ORFs am 3'-Terminus mit hoher Luteovirus-Sequenzhomologie getrennt. Sie kodieren für das Hüllprotein, das Transportprotein und den Blattlausübertragungsfaktor. Die Grundlage der Aufklärung der molekularbiologischen Funktion der BWYV-Proteine bildete die Klonierung und Sequenzierung des Genoms (Veidt et al., 1988). Sequenzvergleiche zwischen BWYV und BMYV bestätigten die postulierte Eigenständigkeit dieser Viren (pers. Mitteilung E. Maiß; Schiemann et al., 1998). Bild 4 erläutert die Genomorganisation des BWYV.

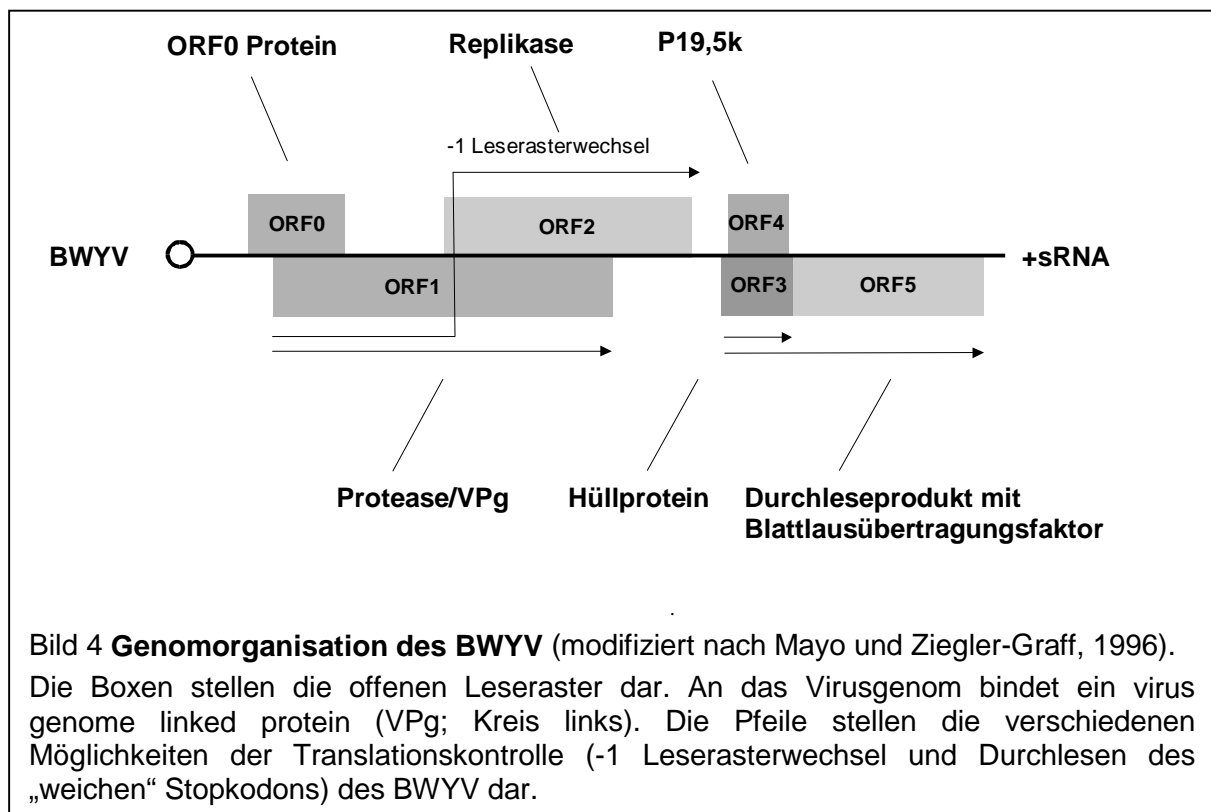
Verschiedene Mechanismen steuern die Expression der Gene des 5.641 bp großen BWYV-Genoms. Von der genomischen RNA werden ORF0, ORF1 und ORF2 direkt translatiert. Anschließend wird eine subgenomische RNA (sgRNA) transkribiert, von welcher die weiteren Leseraster (ORF3, ORF4 und ORF5) exprimiert werden. Die biochemischen Eigenschaften der BWYV-Proteine werden in den folgenden Absätzen kurz beschrieben (Martin et al., 1990; Miller et al., 1995; Mayo und Ziegler-Graff, 1996).

ORF0-Protein: Die Funktion dieses Proteins ist weitgehend unbekannt. Möglicherweise handelt es sich um ein Membran-assoziiertes Protein, welches früh in der Infektion auftritt die Symptome verursacht (Van der Wilk et al., 1997a) und den Wirtskreis bestimmt. Der N-Terminus ist stark hydrophob.

ORF1-Protein: Die ORF1-Proteinsequenzen der Poleroviren besitzen ein Motiv, welches charakteristisch für Proteasen ist (Bazan und Fletterick, 1989). Es wird vermutet, daß das VPg durch das ORF1 kodiert wird (Van der Wilk et al., 1997b). Weitere ORFs könnten innerhalb des ORF1 liegen (Schmitz, 1995; Prüfer et al., 1999).

ORF1/ORF2-Protein: Durch einen ribosomalen Leserasterwechsel wird ein Fusionsprotein exprimiert. Als Signal für den Leserasterwechsel dient eine U/A-reiche Sequenz und eine Sekundärstruktur der RNA (stem-loop). Im Bereich des ORF2-Proteins liegt das Motiv einer RNA-abhängigen RNA Polymerase nahe des C-Terminus: GxxxTxxxN(x)GDD (Kamer et al., 1984). Eines der Proteine des 5'-Terminus besitzt möglicherweise Helikase-Aktivität.

ORF3-Protein: Das ORF3-Protein stellt das Hüllprotein (CP) des BWYV dar. Auf noch unbekannte Weise stimuliert es die Replikation des Virus, hat eine Funktion bei der Übertragung des Virus durch die Blattlaus und wirkt möglicherweise auf den Transport des Virus in der Pflanze ein (Ziegler-Graff et al., 1996).



		<u>αA</u>	<u>αB</u>	<u>αC</u>	
BWYV	MEEDDHAGKHDALSALSQWLWSKPLGQHNADLDDDEEVTGQEELFLPEEQVGARHLFS				59
		<u>β</u>	<u>β</u>	<u>β</u>	
BWYV	QKTISREVPAEQSRSGRVYQTARHSLMECSRPTMSIKSQSWSSSPKPLPKIPVPSLTSWTHTVNS				126
		<u>β</u>			
BWYV	TPFPQLSTSSGSQSPGKGRLQRLTSTERNGTTLPRNTSGSSTKAMVLHR				175

Bild 5 Aminosäuresequenz des P19.5k (modifiziert nach Mayo und Ziegler-Graff, 1996). Die mutmaßlichen drei α -Helices (α A, α B und α C) und β -Faltblätter (β) werden durch Striche oberhalb der Sequenz markiert.

ORF4-Protein: Die meisten Untersuchungen zur Funktion des ORF4-Proteins (P17k) der Luteoviren wurden durch Tacke et al. bei PLRV durchgeführt (Tacke et al., 1991, 1993). Im Alignment der P17k der Luteoviren (Bild 42) zeigen sich Unterschiede zwischen einer N-terminalen Domäne mit drei α -helikalen Regionen, einer negativen Nettoladung und einer C-terminalen Domäne, welche aus einigen β -Flattblättern besteht und eine positive Nettoladung besitzt (Bild 5). Der basische C-Terminus des P17k von PLRV bindet sequenzunspezifisch einzelsträngige Nukleinsäuren (Tacke et al., 1993). Die zweite Helix (Bild 5, α B) des N-Terminus ist möglicherweise amphipatisch mit negativ geladenen Aminosäuren an der Außenseite der Helix. Diese Helix ist möglicherweise für eine Protein-Protein-Interaktion verantwortlich. Das PLRV-P17k wird in planta phosphoryliert (Sokolova et al., 1996). Durch Analogieschluß läßt sich vermuten, daß es sich auch beim BWYV um das Phloem-spezifische Transportprotein (19,5 kDa-Protein; P19,5k) handelt. Es spielte aber keine essentielle Rolle bei der Ausbreitung des Virus in der Wirtspflanze (Ziegler-Graff et al., 1996). Für das BYDV allerdings belegten Chay et al. (1996), daß das P17k unverzichtbar für eine systemische Infektion in Pflanzen ist. Schmitz et al. (1997) konnten das PLRV-P17k in Plasmodesmata lokalisieren.

ORF3/5-Protein: Das ORF3/5-Protein wird durch ein seltenes Ereignis während der Translation des Hüllproteins (ORF3) gebildet. Das Stopkodon des ORF3 wird dabei überlesen (readthrough), und es kommt zur Bildung eines Fusionsproteins. Das Hüllprotein und das Fusionsprotein zusammen bilden das äußere Proteingerüst des Virions. Das Fusionsprotein enthält das Signal für die Blattlausübertragung, welches vermutlich an der Oberfläche des Virions lokalisiert wird. Das Durchleseprodukt ist möglicherweise an der systemischen Ausbreitung des Virus in der Pflanze beteiligt, zusätzlich zum P17k oder stimuliert durch das P17k (Ziegler-Graff et al., 1996; Miller und Rasochová, 1997; Mutterer et al., 1999). Der C-Terminus des Fusionsproteins wird proteolytisch abgespaltet, und die verkürzte Form wird in aufgereinigten Virionen gefunden.

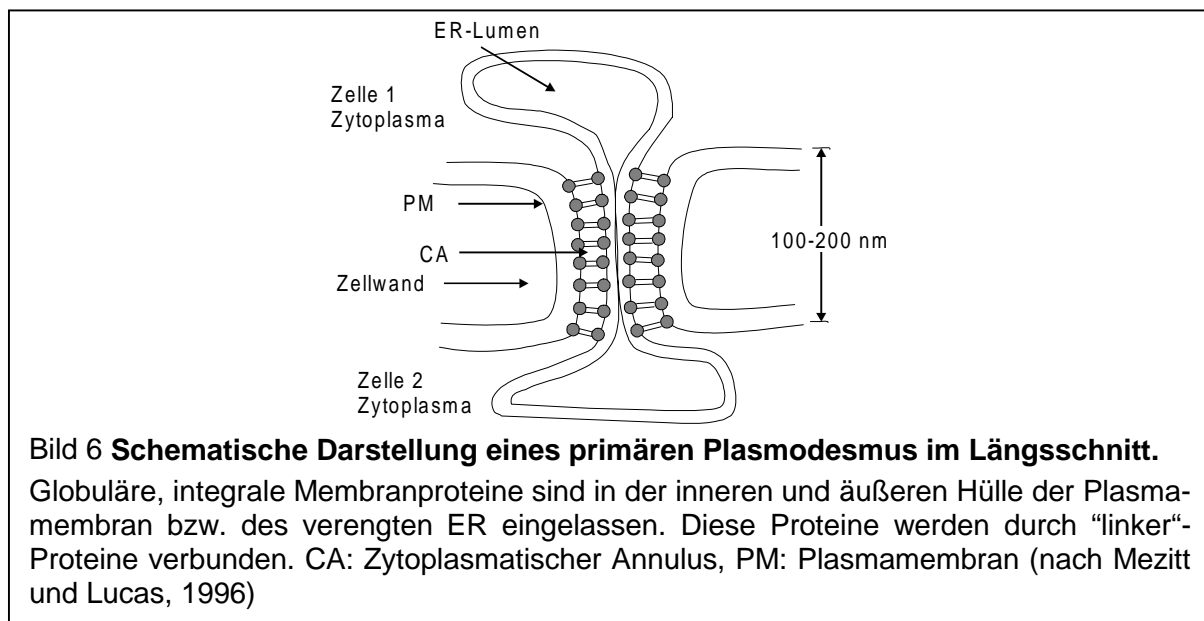
4.4 Ist das P19,5k als Transportprotein in den Plasmodesmata lokalisiert?

Die Ausbreitung von Pflanzenviren von Zelle zu Zelle ist eine notwendige Komponente der viralen Zellzyklen. Es wird allgemein akzeptiert, daß sich während des Infektionsprozesses die meisten Pflanzenviren ihren Weg durch die Plasmodesmata bahnen (Hull, 1989; Maule, 1991; Citovsky und Zambryski, 1991, 1993; Gilbertson und Lucas, 1996; Ghoshroy et al., 1997). In höheren Pflanzen sind Plasmodesmata Plasmamembran-durchzogene, interzelluläre Verbindungen, bestehend aus einem zytoplasmatischen Annulus und einer zentralen, verdichteten Form des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Ein schematischer Längsschnitt durch einen primären Plasmodesmus wird in Bild 6 gezeigt. Diese Kanäle sorgen für die endoplasmatische Kontinuität zwischen benachbarten Zellen (Lucas et al., 1993; Ghoshroy et al., 1997). Während eines späteren Entwicklungszeitpunktes werden neue, sekundäre Plasmodesmata in die Zellwand eingebaut; diese unterscheiden sich wahrscheinlich sowohl funktionell als auch strukturell von den primären Plasmodesmata (Ding et al., 1992).

Die Funktion der Plasmodesmata wird in jüngster Zeit durch einige interessante Ergebnisse aufgeklärt. Das Homeobox-Protein, Knotted-1, kann sich selbst und seine eigene mRNA durch Plasmodesmata in benachbarte Zellen transportieren (Lucas et al., 1995). Es wird ver-

mutet, daß auch Pflanzenviren einen ähnlichen Transportweg entwickelt haben (Lucas und Wolf, 1993; Gilbertson und Lucas, 1996). Dennoch bleibt der detaillierte Mechanismus des Zell-zu-Zell Transports von Pflanzenviren ungeklärt.

Transportproteine haben die Fähigkeit, Plasmodesmata für größere Moleküle durchlässiger zu machen. Sie erhöhen das size exclusion limit (SEL) von 1 kDa auf 10 bis 20 kDa (Citovsky und Zambryski, 1993; Lucas und Gilbertson, 1994). Virale Transportproteine infizierter sowie transgener Pflanzen konnten in Plasmodesmata lokalisiert werden (Ding et al., 1992; Epel et al., 1996; Schmitz et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das TMV P30k-Transportprotein - fusioniert mit dem green fluorescent protein (GFP) - mit dem Zytoskelett ko-lokalisierte (Heinlein et al., 1995, 1998; McLean et al., 1995; Reichel und Beachy, 1998). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Pflanzenviren das Zytoskelett zum intrazellulären Transport, zur Hinleitung zu den Plasmodesmata sowie zur Regulierung ihres Lebenszyklus nutzen (Oparka et al., 1996; Heinlein pers. Mitteilung). Zusätzlich können die pflanzlichen Transportproteine unspezifisch Nukleinsäuren binden (siehe Ghoshroy et al., 1997). Diese Ergebnisse demonstrieren, daß Transportproteine die Möglichkeiten haben, sich von Zelle zu Zelle zu bewegen, Plasmodesmata zu erweitern und die viralen Nukleinsäuren an bestimmte Orte zu leiten. Die Form, in welcher das infektiöse Material sich zwischen den Zellen bewegt (ob als Virion, virale Nukleinsäure und/oder Nukleoprotein-Komplex), mag für die verschiedenen Viren unterschiedlich sein. Eine Reihe von Viren erfordern das Hüllprotein zur Ausbreitung in der Pflanze, während andere ohne ein solches auskommen (siehe Lucas und Gilbertson, 1994). Nachdem die Funktionen der Transportproteine in den letzten Jahren zunehmend deutlicher werden, besteht weiterhin Unklarheit, welche Domänen innerhalb der Proteine für die einzelnen Funktionen verantwortlich sind. Allgemeine Sequenzhomologien oder gemeinsame Strukturdomänen konnten unter den bekannten Transportproteinen verschiedener Pflanzenviren nicht gefunden werden (Mushegian und Koonin, 1993; Mezitt und Lucas, 1996).



Die P17k der Luteoviren werden ebenfalls als Transportproteine angesehen (Tacke et al., 1993; Chay et al., 1996). Durch die Fusion mit dem GFP sollte überprüft werden, ob sich das P19,5k - wie das analoge Protein vom PLRV - in den Plasmodesmata lokalisieren läßt. Das Wissen, wo das putative Transportprotein in der Zelle vorkommt, ist ein wichtiger Schritt zum Verständnis seiner Funktion. Die Eigenschaft des GFP (green fluorescent protein), bei UV- oder Blaulichtbestrahlung grün zu fluoreszieren, ermöglicht eine einfache in vivo-Detektion des Fusionsproteins durch ein Fluoreszenzmikroskop. Das GFP stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*. Das *Aequorea*-GFP ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 26,9 kDa und einer Länge von 238 Aminosäuren (Prasher et al., 1992). Durch Veränderung des Proteins konnten einige GFP-Mutanten erzeugt werden, welche keine kryptische splice site sowie eine stärkere Fluoreszenz im Bereich der üblichen

Fluoreszenzmikroskop-Filtersätze (FITC-Filtersätze) besitzen (Reichel et al., 1996). Eine dieser als red shifted bezeichneten GFP-Mutanten (S65C) wurde in dieser Arbeit als Reportergen verwendet.

Zusätzlich sollten mögliche funktionsrelevante Domänen innerhalb des P19,5k nachgewiesen werden. Die zwei α -Helices des N-Terminus der P17k sind unter den Luteoviren stark konserviert (siehe dazu Bild 5 und Bild 42), deshalb sollten Aminosäuren innerhalb dieser Motive - SQWL (α A) und DDDEE (α B) - durch eine Alanin-Scanning-Mutagenese verändert werden. Der Austausch von Aminosäuren gegen Alanin ermöglicht eine Identifizierung interagierender Seitenketten, die weder die Hauptkettenkonformation verändern (anders als z. B. Glycin oder Prolin) noch starke elektrostatische oder sterische Effekte hervorrufen (Cunningham und Wells, 1989). Eine Variante dieser Methode ist die sogenannte clustered-charged-to-alanine-scanning-mutagenesis. Bei dieser Anwendung werden aufeinander folgende, geladene Aminosäuren durch Alanine ersetzt. Häufungen geladener Aminosäuren finden sich oft an der Proteinaußenseite, die nun durch dieses Verfahren in einer relativ zerstörungsfreien Art untersucht werden können (Wertman et al., 1992). Es ist zu vermuten, daß sich die Aminosäurereste der DDDEE-Domäne in das hydrophile Zellmilieu ausrichten, also sich ebenfalls an der Oberfläche des P19,5k befinden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

radioaktiv markierte Nukleotide	Amersham-Buchler
Restriktionsendonukleasen,	
T4-DNA-Ligase,	
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	
Heringssperma-DNA,	Boehringer Mannheim
AP-konjugierte Antikörper	Dianova
RNAse A	Sigma
MS-Salze und Vitamine	Duchefa
PVDF-Membranen	BioRad
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Millipore
Nylon Plus-Membran	Boehringer Mannheim

5.1.2 Kits

DIG DNA Labeling	
and Detection Kit	Boehringer Mannheim
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Boehringer Mannheim
IsoQuick Nucleic Acid	
Extraction Kit	Microprobe Corporation
RNA-Clean System	AGS
NPTII-Elisa Kit	5 prime-3 prime, West Chester, PA, USA (bezogen über CP Laboratories, GB)
T7-Sequenzierungskit	Pharmacia
Plasmidaufreinigungskit	Qiagen oder Macherey & Nagel

5.1.3 Synthetische Oligonukleotide

zur Amplifikation des 19,5k-Gens (ORF4):

19,5k 5' NcoI:	5' - GAA GAT CAC CAT GGA AGA AGA CGA CCA - 3'
19,5k 3' XbaI:	5' - GCT CTA GAG TCG ACT ACT GAT GAA GAA CCA - 3'

zur Amplifikation des 19,5k-Gens mit HindIII Schnittstelle:

19,5k 3' HindIII:	5' - GGT AAG CTT TTA TCA ATG ATG ATG ATG ATG TGG - 3'
19,5k 5' HindIII:	5' - GAC AAG CTT CGA TGG AAG AAG ACG ACC ACG CA - 3'

zur Amplifikation des nptII-Gens (313 - 806 bp):

nptII 1:	5' - GGT GCC CTG AAT GAA CTG - 3'
nptII 2:	5' - TAG CCA ACG CTA TGT CCT - 3'

5.1.4 Plasmide

pBIN19	Frisch et al., 1995
pe35S	Maiß (unveröffentlicht)
pEA305D HindIII-2	Amann et al., 1983
pGEM	Anon 1989, Promega
pLX222	Landsmann et al., 1988
pRT103	Töpfer et al., 1987
pSK(-)	Anon 1990, Stratagene
pUC19	Vieira und Messing, 1982

Weitere rekombinante Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und werden in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

5.1.5 E. coli Bakterienstämme

NM522	Gough und Murray, 1983
W3110	Brent und Ptashne, 1981
DH5 α	Hanahan, 1983
XL1-blue	Bullock et al., 1987
CJ236	Kunkel et al., 1987

5.1.6 Virus-Isolate

BWYV-Isolat BN 5 ASL	Graichen (BAZ Aschersleben)
----------------------	-----------------------------

5.1.7 Mono- und polyklonale Antikörper, gerichtet gegen das Hüllprotein des BWYV

Die Antikörper BLRV-MAB 5G4 und AS0142 BLRV IgG wurden von der DSMZ, Abteilung Pflanzenviren, zur Verfügung gestellt.

5.1.8 Standardlösungen und Medien

TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
10 x PBS:	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ 800 ml H ₂ O, mit HCl auf pH 7,4 einstellen; ad 1 l
LB-Medium (modifiziert):	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 1 g/l Saccharose pH 7,0 15 g/l Agar bei festem Medium
SOB:	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 10 ml/l einer sterilen 1 M MgCl ₂ -Lösung (nach dem Autoklavieren) pH 7,5
SOC:	SOB-Medium mit 20 mM Glukose (20 ml einer filtersterilisierten 1 M Glucose-Lösung pro Liter SOB)

5.2 Allgemeine Methoden

Die Methoden wurden, falls nicht anders beschrieben, aus „molecular cloning - a laboratory manual“ verwendet (Sambrook et al., 1989).

5.2.1 Sterilisationsverfahren

Medien und Lösungen wurden für 24 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Glasgeräte wurden entweder 4 h bei 240°C sterilisiert oder ebenfalls autoklaviert. Lösungen thermolabiler Substanzen wurden mit Hilfe eines 0,2 μ m Sterilfilters filtriert.

5.2.2 Phenolisierung von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäuren wurde der Reaktionsansatz mit 1 Vol TE-Puffer gesättigtem Phenol gründlich gemischt und zur Phasentrennung 5 min bei 14.000 UpM zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde anschließend mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1 v/v) erneut extrahiert und wieder bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Eine weitere Extraktion wurde mit 1 Vol Chloroform durchgeführt, um Spuren von Phenol aus der wäßrigen Phase zu entfernen.

5.2.3 Nukleinsäurefällung mit Ethanol oder Isopropanol

Nukleinsäuren in wäßriger Lösung wurden mit 1/10 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 2 Vol abs. Ethanol (bzw. 1 Vol Isopropanol) wenige Minuten bis Stunden auf Eis gefällt. Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden mindestens 5 min bei 14.000 UpM sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

5.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei entsprach eine Extinktion von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 mg/ml dsDNA bzw. 40 mg/ml ssRNA. Die Reinheit einer Nukleinsäure wurde durch den Quotienten der Extinktion 260 nm/280 nm angegeben. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

5.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat pH 7,5; 20 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA
EtBr-Stammlösung:	10 g/l in H ₂ O
TAE-Puffer mit EtBr:	60 - 100 µl EtBr-Stammlösung pro Liter TAE-Puffer
Probenpuffer (6fach):	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol FF; 15% Ficoll 400 in H ₂ O

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte je nach Größe in 0,5 - 2%igen Agarosegelen (w/v in TAE-Puffer optional mit EtBr) bei einer Spannung von 15 bis 100 Volt (4 V/cm gelten als Richtwert). Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/6 Probenpuffer gemischt. Nach ausreichender Laufzeit wurde das Gel unter UV-Licht visualisiert.

5.2.6 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht von Agrobakterien erfolgte durch Animpfen einer Einzelkolonie in 10 ml LB-Medium. Die Vermehrung erfolgte unter geeigneten Selektionsbedingungen; dazu wurde dem Medium ein sterilfiltriertes Antibiotikum zugesetzt. Die Inkubation erfolgte ü/N bei 28°C durch Schütteln bei 200 UpM.

E. coli wurde in flüssigem LB-Medium bei 37°C für ca. 16 h vermehrt. Ein optimales Wachstum wurde durch kräftiges Schütteln der Kulturen in einem Rotationsschüttler bei ca. 220 UpM erreicht. Größere Kulturen ab 100 ml wurden mit der Vorkultur inokuliert. Eine Vorkultur wurde durch Übertragung von Zellen aus einer Einzelkolonie angezogen. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden die Bakterien in 3 ml LB-Medium überführt.

Antibiotika-Konzentrationen:

	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Ampicillin	100 µg/ml	nicht verwendbar
Kanamycin	50 µg/ml	50 µg/ml
Rifampicin		50 µg/ml
Tetracyclin	25 µg/ml	10 µg/ml

Die Stammhaltung der Mikroorganismen erfolgte auf festen Nährmedien oder in Dauerkulturen.

Für die Stammhaltung auf festen Nährmedien wurden die Agarplatten nach Beimpfen für 48 h bei 28°C für Agrobakterien und bei 37°C für *E. coli* im Dunkeln inkubiert und an-

schließlich bei 4°C gelagert. In regelmäßigen Abständen (1 - 2 Monate) wurden Einzelkolonien auf frische Agarplatten überimpft.

Für Dauerkulturen wurde das Mikrobank-System der Firma Mast Diagnostik (Reinfeld) verwendet. Die Kryogefäße wurden bei -75°C gelagert.

5.3 Klonierung von DNA in *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

5.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur enzymatischen Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen eingehalten. Zur Identifizierung klonierter Nukleinsäurefragmente in rekombinanten Plasmiden wurden 3 - 5 µl einer analytischen Plasmidpräparation in Gegenwart von 10 U des entsprechenden Enzyms und Spaltpuffers für ca. 1 h inkubiert.

5.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Nach Spaltung von Vektor-DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde diese zusätzlich mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt, um die endständigen 5'-Phosphatgruppen zu entfernen und damit eine Rezirkularisierung der Vektor-DNA bei der Ligation zu verhindern. Ca. 1 - 2 µg Vektor-DNA wurden mit 1 µl CIP (1 U/ml) in 1 x CIP-Puffer in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10minütige Inkubation bei 75°C gestoppt. Anschließend wurde mit Phenol bzw. Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA gefällt.

5.3.3 Amplifizierung von DNA-Sequenzen mit Hilfe der PCR

Spezifische DNA-Sequenzen wurden unter Verwendung zweier spezifischer Primer und der Taq-Polymerase amplifiziert.

Ein Standard-Ansatz war:

x µl DNA (1 - 100 ng)
 5 µl Goldstar Polymerase Puffer (10 x)
 2,5 µl Primer 5' (10 µmol)
 2,5 µl Primer 3' (10 µmol)
 5 µl 25 mM MgCl₂
 1 µl 10 mM dNTPs
 0,5 µl Goldstar Polymerase
 auffüllen mit H₂O auf 50 µl Endvolumen.

Die Programme für die Amplifizierung im Biomed Thermocycler variierten je nach Probe und eingesetzten Primern.

Ein grundsätzliches Schema war für diese Anwendung:

	3 min	94°C	Denaturierung
3 Zyklen:	90 s	94°C	Denaturierung
	60 s	37°C	Annealing
	90 s	72°C	Elongation
27 Zyklen:	90 s	94°C	Denaturierung
	60 s	50 - 60°C	Annealing
	90 s	72°C	Elongation
	last delay 5 min 72°C		

Die Annealing-Temperatur und die Zyklenzahl konnten je nach Versuch schwanken.

5.3.4 Mutagene Megaprime-PCR

Ein DNA-Fragment wurde bis zu der Stelle, die mutagenisiert werden sollte, mit einem Primer der mutierten Sequenz amplifiziert. Anschließend wurde das Amplifikat isoliert und als

Primer für eine zweite PCR eingesetzt. In dieser zweiten PCR wurde dann das gesamte Fragment amplifiziert.

Ansatz der ersten PCR:

- 1 µl Template-DNA (ca. 10 ng)
- 5 µl Goldstar Polymerase Puffer (10 x)
- 2,5 µl Primer 5' (10 µmol)
- 2,5 µl mutagener Primer 3' (10 µmol)
- 5 µl 25 mM MgCl₂
- 1 µl 10 mM dNTPs
- 0,5 µl Taq-Pol (0,5 U/µl Eurogentec-Goldstar Pol.)
- auffüllen mit H₂O auf 50 µl Endvolumen.

Folgende Zyklusbedingungen wurden eingestellt:

- 2 min 94°C Denaturierung
- 3 Zyklen:
 - 60 s 94°C Denaturierung
 - 60 s 37°C Annealing
 - 45 s 72°C Elongation
- 27 Zyklen:
 - 60 s 94°C Denaturierung
 - 60 s 52°C Annealing
 - 45 s 72°C Elongation

Die amplifizierte DNA wurde elektrophoretisch in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, das Fragment herausgeschnitten und mit dem QIAEX-Kit von QIAGEN aufgereinigt. Die DNA wurde in 20 µl bidest. H₂O aufgenommen.

Ansatz der zweiten PCR:

- 1 µl Template-DNA (ca. 10 ng)
- 5 µl Goldstar Polymerase Puffer (10 x)
- 20 µl Mega-Primer
- 2,5 µl mutagener Primer 3' (10 µmol)
- 5 µl 25 mM MgCl₂
- 1 µl 10 mM dNTPs
- 0,5 µl Taq-Pol (0,5 U/µl Eurogentec-Goldstar Pol.)
- auffüllen mit H₂O auf 50 µl Endvolumen.

Folgende Zyklusbedingungen wurden eingestellt:

- 2 min 94°C Denaturierung
- 3 Zyklen:
 - 60 s 94°C Denaturierung
 - 60 s 37°C Annealing
 - 45 s 72°C Elongation
- 27 Zyklen:
 - 60 s 94°C Denaturierung
 - 60 s 52°C Annealing
 - 45 s 72°C Elongation

Um das Amplifikat von dem langen Primer zu trennen, wurde der Ansatz in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, das entsprechende Fragment herausgeschnitten und aufgereinigt.

5.3.5 Isolierung von DNA aus präparativen Agarose-Gelen

Je nach Bedarf wurden 1 bis 10 µg DNA mit den erforderlichen Restriktionsendonukleasen verdaut und die Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Die gewünschten Banden wurden unter UV-Licht herausgeschnitten und gewogen.

Die Extraktion erfolgte mit dem QIAEX-Kit (Qiagen) nach Protokoll. Die Agarosematrix wurde mit Jod aufgeschlossen, die DNA an Kieselgelkugeln gebunden und in mehreren Zentrifugationsschritten mit unterschiedlichen Puffern gereinigt. Die DNA-Fragmente wurden nach Abschluß der Extraktion in TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

5.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA-Fragmente wurden mit dephosphorylierter und gespaltenen Vektor-DNA im molaren Verhältnis 3 : 1 mit Hilfe der T4-DNA-Ligase verknüpft. Der Ligationsansatz wurde wie folgt zusammengestellt:

100 - 500 ng Vektor-DNA
entsprechende Konzentration DNA-Fragment
2 µl 10 x Ligationspuffer
0,5 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl)
mit H₂O auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl gebracht.

Der Ansatz wurde ü/N bei 16°C inkubiert und anschließend 1 - 3 µl zur Transformation von elektro-kompetenten *E. coli*-Zellen eingesetzt.

5.3.7 In vitro-Mutagenese

PEG-Lösung:	25% PEG 10.000; 3,2 M NaCl
Annealing-Puffer (10 x):	200 mM Tris-HCl pH 7,4; 20 mM MgCl ₂ ; 500 mM NaCl
T4-Kinase-Puffer (10 x):	500 mM Tris-HCl pH 7,6; 70 mM MgCl ₂ ; 50 mM DTT
YT-Medium:	8 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl

Die verwendete Methode basiert auf einem Protokoll von Kunkel et al. (1987). Die Strategie der site directed mutagenesis beginnt mit der Klonierung der zu mutierenden Sequenz in einem Vektor, von welchem man einzelsträngige DNA gewinnen kann. Ein Oligonukleotid, das teilweise komplementär zu der zu verändernden Region ist und die gewünschte Mutation trägt, wird an die Einzelstrang-DNA hybridisiert. Eine DNA-Polymerase nutzt anschließend das Oligonukleotid als Primer und synthetisiert den Komplementärstrang. Nach Beendigung der Auffüllreaktion und dem Verschluß der neuen Kette mit einer Ligase wird die Doppelstrang-DNA in *E. coli* transformiert. Dieses einfache Verfahren würde Nachkommen mit der durch das Oligonukleotid herbeigeführten Mutation sowie Nachkommen mit dem Ursprungsgenotyp liefern.

Der erste Schritt dieser Methode ist die Präparation von Einzelstrang-DNA. Von den pBluescript (SK)-Vektoren kann mit dem Helferphagen M13K07 ssDNA gewonnen werden. Diese Plasmide enthalten den Replikationsursprung (ori) des Phagen f1, der eng mit M13 verwandt ist. Der aus M13 entwickelte Helferphage M13K07, der einen mutierten Replikationsursprung trägt, kann pBluescript-Phagemide effektiver (im Verhältnis 50 : 1) als sein eigenes Genom in ssDNA-Form produzieren. Die ssDNA „Phagemide“ werden enkapsidiert und ins Kulturmedium ausgeschleust.

Zur Ausschleusung von ssDNA wurden *E. coli* CJ236 Zellen, die mit den rekombinanten pSK(-)-Vektoren transformiert waren, in 2 x YT-Medium (mit Amp) ü/N angezogen. Mit 20 µl dieser Übernacht-Kultur wurden 2 ml 2 x YT-Medium (mit Amp) inokuliert. Nach zweistündigem Wachstum bei 37°C wurden 10 µl M13K07-Helferphagenkultur (10⁹ pfu/ml) zugefügt. Diese Kultur wurde 10 min stehengelassen und 1 h bei 37°C geschüttelt. Zur Selektion infizierter Zellen wurde Kanamycin in einer Endkonzentration von 60 µg/ml hinzugefügt. Am folgenden Tag wurden die Zellen geerntet. Die Kultur wurde 10 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. 1,6 ml des Überstandes wurde mit 320 µl PEG-Lösung versetzt und 30 min auf Eis gestellt. Zur Gewinnung des Sediments wurde für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Das Pellet wurde durch

Vortexen gelöst. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Aufreinigung. Die ssDNA wurde durch Zugabe von 0,1 Vol 7,5 M $\text{NH}_3^+\text{HCO}_3^-$ und 2 Vol 100%igem Ethanol 30 min bei -20°C gefällt. Die zentrifugierte, mit 70%igem Ethanol gewaschene und getrocknete Nukleinsäure wurde in 20 μl TE-Puffer aufgenommen. 2 μl dieser Lösung wurde im analytischen Agarosegel überprüft.

Die Oligonukleotide mußten für die nachfolgende Ligation am 5'-OH Ende phosphoryliert werden. Folgende Lösungen wurden für einen 25 μl Ansatz zusammengefügt:

2 μl Primer (ca. 10 pmol/ μl)
 2,5 μl 10 x Kinase-Puffer
 20 μl H_2O
 0,5 T4-Kinase 9,2 U

Das Reaktionsgefäß mit dem Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA wurde die Reaktion beendet. Anschließend wurde die Kinase 10 min bei 70°C inaktiviert.

Die phosphorylierten Primer wurden mit 0,2 bis 1 μg ssDNA-template im Annealing-Puffer hybridisiert. Nach einer Temperaturerhöhung auf über 70°C wurde die Reaktion langsam auf RT abgekühlt.

Die einzelnen Komponenten wurden in folgenden Volumina angesetzt:

0,5 bzw. 1 μl ssDNA
 1 μl Primer
 1 μl 10 x Annealing-Puffer
 und mit H_2O auf 10 μl aufgefüllt.

Der Ansatz wurde in ein Schmelzpunktröhrchen gegeben und mit einer 10- μl -Pipette in die Mitte des Röhrchens gedrückt. Anschließend wurden die beiden Enden des Röhrchens zugeschweißt. Das Röhrchen wurde in ein Zentrifugenröhrchen, das mit H_2O gefüllt war, gestellt und 5 min in einem Becherglas mit kochendem Wasser belassen. Das Becherglas mit den beiden Röhrchen wurde von der Heizquelle genommen. Nach 30 min wurde das Zentrifugenröhrchen aus dem Becherglas entnommen und in einen Ständer gestellt. Nachdem die Wassertemperatur in dem Zentrifugenröhrchen unter 25°C gesunken war, wurde das Röhrchen aufgesägt und der Inhalt in ein Eppendorfgefäß geblasen. Das Eppendorfgefäß wurde auf Eis gestellt.

Zur in vitro DNA-Synthese wurden dem Eppendorfgefäß mit dem Hybridisierungsansatz

2 μl Synthese-Puffer (10 x)
 1 μl T_4 -Ligase
 1 μl T_4 -Polymerase
 5 μl H_2O

zugefügt. Die Reaktion stand 2 min auf Eis und 5 min bei RT. Die Polymerisierung lief 1,5 h bei 37°C . Der synthetisierte Doppelstrang konnte zur Transformation von kompetenten E. coli-Zellen eingesetzt werden.

5.3.8 Sequenzierung von dsDNA mit T7-Polymerase

Annealing-Puffer (10 x): 300 mM Tris-HCl, pH 8,0; 70 mM MgCl_2 ; 350 mM NaCl

Stop-Puffer: 37% Formamid; 50 mM EDTA; 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylenblau, pH 8,0

Doppelsträngige Plasmid-DNA wurde mit dem T7-Sequenzierungskit der Firma Pharmacia analysiert. Die Reaktion beruht auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977). Die DNA mußte einen hohen Reinheitsgrad aufweisen, deshalb wurde die DNA mit dem Plasmid-Isolierungs-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt.

Vor der Sequenzierreaktion wurde die dsDNA wie folgt denaturiert:

Zur Denaturierung der DNA wurde die wäßrige DNA-Lösung (2 - 5 μg) mit 1/10 Vol 2 M NaOH, 2 mM EDTA versetzt und bei 37°C für 5 min inkubiert. Die Mischung wurde durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M Na-Acetat pH 5,0 neutralisiert und die DNA in 2,5 Vol abs. Ethanol 5 min bei -70°C gefällt. Nach 15minütiger Zentrifugation wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 11 μl H_2O aufgenommen.

Der Sequenzierungsprimer wurde im folgenden Schritt an die DNA hybridisiert. Der denaturierte Ansatz wurde mit 1 µl Primer (20 ng/µl) und 2 µl Annealing-Puffer (10 x) versetzt. Die Hybridisierungslösung wurde 5 min auf 65°C erwärmt. Dieser Ansatz wurde zur Anlagerung des Primers an die DNA langsam auf 30°C abgekühlt (mindestens 30 min) und anschließend bis zur Markierungsreaktion auf Eis aufbewahrt.

Der Labeling-Mix wurde wie folgt zusammengefügt:

3 µl Label dNTP Mix
1 µl 0,1 M DTT
0,5 - 1 µl α P³² dCTP (3.000 Ci/mmol)
0,2 µl T7-Polymerase (7 Units/µl)
aufzufüllen auf 7 µl mit H₂O.

6 µl dieses Labeling-Mixes wurden zu der Hybridisierungslösung (14 µl) gegeben und durch kurzes Zentrifugieren vereinigt. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert. Von dieser Reaktion wurden je 4,5 µl in vier verschiedenfarbige Eppendorfgefäße mit jeweils 2,5 µl ddNTPs-Stopmix pipettiert. Die Kettenabbruchreaktion erfolgte bei 37°C für 5 min und wurde durch Zugabe von 3 µl Stop-Puffer beendet. Bis zur Gelelektrophorese wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt. Sie mußten vor dem Einfüllen in die Taschen 5 min gekocht werden.

5.3.9 Elektrophorese von radioaktiv markierten DNA-Strängen

Acrylamid-Stammlösung (40%): 380 g/l Acrylamid
20 g/l Bisacrylamid

10 x TBE: 163,54 g/l Tris
27,82 g/l Borsäure
9,31 g/l EDTA
pH sollte bei 9,06 liegen.

Laufpuffer: 0,6 x TBE-Puffer

Acrylamidlösung zur Präparation des Sequenziergeles:

33,6 g Harnstoff
9,6 ml Acrylamid-Stocklösung
9,6 ml 10 x TBE-Puffer
aufzufüllen auf 80 ml mit H₂O.
640 µl 10% APS; 64 µl TEMED

Die Elektrophorese wurde mit der Sequenziervorrichtung „Macrophor System 2010“ (LKB) und mit 5%igen Gradientengelen mit einer zunehmenden Stärke von 0,2 mm bis 0,7 mm für 3,5 h bei 55°C und 35 W ausgeführt.

Nach dem Lauf wurde der Harnstoff mit 10%iger (v/v) Essigsäure unter Schwenken (1 h) aus dem Gel entfernt und das Gel bei 80°C getrocknet, bevor für mindestens 12 h ein Röntgenfilm (Agfa Curix) aufgelegt wurde.

Der Film wurde anschließend entwickelt.

5.3.10 Herstellung von elektrokompetenten Bakterien und Transformation

Für *E. coli*:

Die Vorbereitung der Zellen sowie die Transformation wurden nach der Vorschrift der Firma Bio-Rad (high efficiency electro-transformation of *E. coli*) durchgeführt.

Ein Liter LB-Medium wurde mit 10 ml einer *E. coli* Vorkultur angeimpft und unter kräftigem Schütteln in einem 2 l-Erlenmeyerkolben bei 37°C bis OD₆₀₀ = 0,5 inkubiert. Der Kolben wurde für 15 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Kultur in Zentrifugenbecher gefüllt, 15 min bei 4°C und 4.000 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in mehreren Waschschritten mit sterilem bidest. H₂O vom Medium gereinigt und in 2 ml 10%igem Glycerin aufgenommen. Die Bakterien wurden in 40 µl Portionen bei -70°C eingefroren.

Die kompetenten Zellen wurden vorsichtig aufgetaut und dann sofort mit 1 - 3 μ l Ligationsansatz oder Plasmid-DNA gemischt. Nach einer Minute wurde die Mischung in einer vorgekühlten 2 mm-Elektroporationsküvette elektroporiert.

Es wurde folgende Geräteeinstellung gewählt:

2,5 kV; 25 μ F und 200 Ω (BioRad Gene Pulser)

Nach der Elektroporation wurde sofort 1 ml SOC-Medium in die Küvette gegeben und in einem Eppendorfgefäß ein bis zwei Generationszyklen (20 - 40 min) bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden Aliquots des Ansatzes auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die Anzucht der Kolonien erfolgte ü/N bei 37°C. Wurde durch die Klonierung eine α -Komplementation der β -Galaktosidase ermöglicht, dann war die Selektion von Transformanten mit rekombinanten Plasmiden unter Zuhilfenahme von X-Gal (40 mg/l Medium) und IPTG (47,6 mg/l Medium) haltigen Agarplatten möglich. Transformanten mit Insertion bildeten weiße Transformanten, ohne Insertion dagegen blaue Kolonien.

Für *A. tumefaciens*:

CPY-Medium:

5 g/l Saccharose

5 g/l Bacto Trypton

1 g/l Hefeextrakt

pH 7,5 mit NaOH einstellen

nach dem Autoklavieren

auf 2 mM MgSO₄ x 7 H₂O bringen.

15 g Agar bei festem Medium

Waschpuffer:

1 mM Hepes, pH 7,0 mit KOH einstellen

Ein Liter CPY-Medium wurde mit 10 ml einer *A. tumefaciens* Vorkultur angeimpft und unter kräftigem Schütteln in einem 2 l-Erlenmeyerkolben bei 28°C bis OD₆₀₀ = 0,5 bis 1 inkubiert. Anschließend wurde ähnlich, wie für *E. coli* (siehe oben) beschrieben, verfahren.

Folgende Modifikationen wurden durchgeführt:

Zur Eliminierung des Mediums wurde statt Wasser der Hepes-Waschpuffer verwendet.

Der „Gene Pulser“ wurde auf 2,5 kV; 25 μ F und 400 Ω eingestellt. Die elektroporierten Zellen wurden mit 1 ml CPY-Medium verdünnt und 2 - 4 h bei 28°C inkubiert. Die Bakterien wurden in verschiedenen Volumina auf Antibiotika-haltigen LB-Platten ausgestrichen. Nach 48stündigem Wachstum bei 28°C im Dunkeln wurde die Transformationsrate bestimmt.

5.3.11 Analytische Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979).

Lösung 1: 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose

Lösung 2: 0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS

Lösung 3: 3 M Na-Acetat, pH 4,8

Für *E. coli*:

Mit einem sterilen Zahnstocher wurden Bakterien aus Einzelkolonien entnommen und in 3 ml LB-Medium überführt. Die Bakterienvermehrung erfolgte in Reagenzgläsern bei 37°C in einem Rotationsinkubator ü/N. 1,5 ml der Kultur wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge 30 s zentrifugiert. Das Pellet wurde durch starkes Vortexen in 200 μ l Lösung 1 aufgenommen. Die Zellen lysierten nach Zugabe von 200 μ l Lösung 2. Vorsichtig wurden 200 μ l Lösung 3 zugegeben. Um den Überstand mit den Plasmiden vom Präzipitat zu trennen, wurde 10 min bei 14.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, optional mit Phenol aufgereinigt und mit Alkohol gefällt. Die DNA wurde in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (ca. 40 - 50 μ l) aufgenommen. Zur Identifizierung der rekombinanten Plasmide wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt.

Alternativ wurden Plasmide mit einem Kit der Firma Qiagen (Mini-Präp) gereinigt.

Für *A. tumefaciens*:

Die Plasmidisolierung aus *A. tumefaciens* erfolgte mit einigen leichteren Änderungen:

Es wurden 3 ml Bakterienkultur verarbeitet. Nach der Zugabe von 400 µl Lösung 2 wurde 10 min inkubiert und später 300 µl Lösung 3 zugesetzt. Der Überstand wurde phenolisiert. Nach Alkoholfällung wurde das Nukleinsäurepellet in ca. 20 µl TE-Puffer resuspendiert.

5.3.12 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit den Kits der Firma. Die Durchführung richtete sich nach den Protokollen von Qiagen. Sie basierte auf der oben beschriebenen Methode von Birnboim und Doly, an die sich eine Aufreinigung über eine Kieselgelsäule anschloß.

Das Eluat wurde mit Isopropanol gefällt und die DNA in TE-Puffer gelöst. Die Konzentration und die Reinheit wurden mit einem Photometer ermittelt.

5.4 Gewinnung von Nukleinsäuren aus pflanzlichem Gewebe

5.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNA-Clean System der Firma AGS.

Junge Blätter wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörser zu einem feinen Pulver verarbeitet. 100 mg des Homogenats wurden in ein 2 ml-Eppendorfgefäß eingewogen. Nach Zugabe von 1,9 ml RNA-Clean wurde die Probe auf einem Rotationschwenker 5 min bewegt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und weiter - wie im Protokoll des RNA-Clean Systems beschrieben - verfahren. Die isolierte RNA wurde in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Die Ausbeute wurde im Photometer bestimmt. Zur kurzzeitigen Aufbewahrung wurde die Gesamt-RNA bei -20°C gelagert.

5.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe

Angewendet wurde das IsoQuick-System der Firma Microprobe Corporation.

Junges Blattgewebe wurde in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver verrieben. 100 mg des Gewebes wurden in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Das Homogenat wurde in 50 µl Probenpuffer (sample buffer) aufgenommen und mit 100 µl Lysispuffer (lysis buffer) vermischt. Diese Lösung wurde weiter nach Protokoll „Rapid DNA Extraction“ verwendet. In den anschließenden Reaktionsschritten wurde die DNA gereinigt und gefällt. Das Nukleinsäure-Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst, das Eppendorfgefäß 30 min bei 65°C in einem Inkubatorblock sanft geschüttelt und zur vollständigen Lösung der DNA ü/N bei 4°C inkubiert. Die Qualität der genomischen DNA, d. h. ob sie als hochmolekulare DNA vorlag, wurde in einer analytischen Agarosegelelektrophorese getestet. Dazu wurden 5 µl DNA-Lösung verwendet. Die gewonnene DNA ließ sich zur Fragmentierung mit Restriktionsendonukleasen verwenden.

5.5 Hybridisierungsanalyse von Nukleinsäuren

5.5.1 Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden

Die Detektion von single copy-Genen im Pflanzengenom verlangte eine sehr sensitive Nachweismethode. Diese Sensitivität wurde unter anderem durch die Verwendung des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ von Boehringer Mannheim erreicht. Die PCR lieferte DIG-markierte Sonden, welche direkt zur Hybridisierung verwendet werden konnten. Der PCR-Markierungsansatz bestand aus den angegebenen Reagenzien:

0,5 µl DNA (1 - 100 ng)

5 µl Goldstar Polymerase Puffer (10 x)

2,5 µl Primer 5' (10 µmol)

2,5 µl Primer 3' (10 µmol)
 5 µl 25 mM MgCl₂
 10 µl PCR DIG-Mix (5 x)
 1 µl Goldstar Polymerase
 mit H₂O auf 50 µl Endvolumen auffüllen.

Folgende Zyklusbedingungen wurden eingestellt:

3 min 94°C Denaturierung
 35 Zyklen:
 45 s 94°C Denaturierung
 60 s 53°C Annealing
 120 s 72°C Elongation
 last delay 5 min 72°C

Nach der Amplifikation wurde zur Kontrolle 5 - 10 µl des PCR-Ansatzes durch Agarose-Gel-elektrophorese analysiert.

5.5.2 Southern-Blot und Hybridisierung pflanzlicher genomischer DNA

Southern I: 0,5 M NaOH; 1 M NaCl

Southern II: 0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 3 M NaCl

Zur Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen in Genomen oder Plasmiden wurde die Methode des Southern-Blots entwickelt (Southern, 1975; Sambrook et al., 1989). Sie basiert auf einem Transfer elektrophoretisch getrennter DNA-Fragmente auf einen Nukleinsäurebindenden Träger.

Die genomische Pflanzen-DNA (10 - 20 µg) wurde mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und in einer analytischen Agarosegelelektrophorese auf vollständige Fragmentierung überprüft. Die verwendete Restriktionsendonuklease wurde anschließend durch Inkubation des Restriktionsansatzes für 10 min bei 65°C inaktiviert. Das Volumen der DNA-Lösung wurde in einer Speed-Vac-Apparatur auf ca. 25 µl reduziert. Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,8%igen Agarosegel ohne EtBr aufgetrennt und nach dem Lauf das Gel in EtBr-TAE-Puffer angefärbt.

Das Gel wurde anschließend 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt, zweimal für 20 min in Southern I-Lösung und anschließend in Southern II-Lösung gebadet. Danach wurde das Gel in 20 x SSC gelegt.

Mittels Kapillartransfers wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (N⁺, Boehringer Mannheim) übertragen. Die Membran wurde nach dem Transfer in 2 x SSC gewaschen und 2 min auf Whatman 3MM Papier getrocknet. Durch UV-crosslinking und 30minütiges Backen bei 80°C wurde die DNA auf der Oberfläche des Trägers fixiert.

Zur Detektion von Nukleinsäuresequenzen wurde die fragmentierte DNA, welche auf einem Träger fixiert worden war, mit einer DIG-markierten Sonde der Zielsequenz hybridisiert. Anschließend band ein mit alkalischer Phosphatase (AP) gebundener Antikörper an die DIG-Moleküle. Die AP setzte im letzten Schritt ein Chemilumineszenz-Substrat um, welches nach Abspaltung einer Phosphatgruppe Licht emittierte. Das ausführliche Protokoll beschreibt das Handbuch „The DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ von Boehringer Mannheim.

Die Membran aus dem Southern-Blot wurde ca. 4 h in Easy-Hyb (Boehringer Mannheim) bei 42°C prähybridisiert. Die Hybridisierung fand ebenfalls in Easy-Hyb statt. Die Sondenkonzentration in der Lösung wurde gemäß Anweisung des Detektionsprotokolls von Boehringer Mannheim ermittelt und eingesetzt (erfahrungsgemäß ca 1 - 2 µl PCR-DIG-Sonde/ml Easy-Hyb). Die Hybridisierung vollzog sich in einer Folientüte, in welcher die Membran schon zur Prähybridisierung eingeschweißt worden war, bei 42°C unter leichtem Schütteln im Wasserbad für ca. 20 h. Anschließend wurden die überschüssigen Sondenmoleküle durch 15minütiges Waschen mit 2 x SSC; 0,1% SDS bei RT und 0,5 x SSC; 0,1% SDS bei 65°C entfernt. Die Detektion erfolgte nach einem Protokoll der Firma Boehringer Mannheim (s.o.) zur Detektion von single copy-Genen mit leichten Veränderungen.

Die folgenden Punkte wurden modifiziert:

Puffer II:	2% Blockingreagenz
Anti-DIG-FAB:	1 : 6.000 verdünnt
Waschen:	3 x 15 min
Chemilumineszenzreagens:	CDP-Star

Es wurde auf Sauberkeit der benutzten Gefäße Wert gelegt. Es empfahl sich ein Hitze-sterilisieren der Metallschalen bei 240°C für 4 - 6 h. Die verwendeten Lösungen wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

Die Autoradiographie erfolgte durch Auflegen eines Agfa-Curix RP1 Films in der Dunkelkammer. Der erste Film wurde 5 min in einer Autoradiographiekassette der Firma Intas exponiert. Die Filme wurden in einer Entwicklermaschine der Firma Agfa (Curix) entwickelt.

5.5.3 Northern-Blot und Hybridisierung pflanzlicher RNA

5 x MOPS	0,2 M MOPS; 50 mM Na-Acetat; 5 mM EDTA, pH 7,0 Die Lösung wurde sterilfiltriert bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.
----------	---

Gelladepuffer:	565 µl 87% Glycerin 5 µl 0,2 M EDTA 4 mg Bromphenolblau 4 mg Xylencyanol FF 430 µl H ₂ O
----------------	---

Transferpuffer:	5 x SSC, 10 mM NaOH
-----------------	---------------------

Die Gesamt-RNA wurde im Formaldehyd/Formamid-Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde wie folgt hergestellt:

1,2 g Agarose wurde in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit 62 ml H₂O in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach sanftem Schütteln wurde der Agaroselösung 20 ml 4°C kalter 5 x MOPS-Puffer und 17,86 ml 37%iges Formaldehyd (Endkonzentration 2,2 M) hinzugegeben. Die Lösung wurde gründlich gemischt und unter einem Abzug in einen vorbereiteten 15 x 11 cm Gelträger gegossen. Zum Polymerisieren wurde das Gel 1 h stehengelassen.

Vor der Elektrophorese mußte die Gesamt-RNA denaturiert werden:

9 µl RNA (ca. 20 - 30 µg)
4 µl 5 x MOPS
7 µl Formaldehyd (37%)
20 µl Formamid

Die Lösung wurde 15 min bei 55°C erwärmt und anschließend mit 2 µl Gelladepuffer versetzt. Die Proben lagerten bis zum Laden ins Gel auf Eis.

Die Elektrophorese fand in 1 x MOPS mit 0,22 M Formaldehyd statt. Dazu wurde die Kammer bis knapp zur Geloberseite mit dem Laufpuffer gefüllt. Dieses verhinderte eine Verzerrung der Banden im Gel. Es wurde eine Spannung von 4 - 5 V/cm angelegt. Der Puffer in der Kammer wurde während des Laufes mehrmals gemischt.

Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim):

Das Gel wurde vorsichtig in eine Schale mit 5 x SSC gelegt. Unter Schütteln wurde es für 5 - 10 min gewaschen. Das Gel wurde auf eine Blotting-Apparatur mit Transferpuffer gelegt. Der Transfer der RNA erfolgte durch das Auflegen einer trockenen, positiv geladenen Nylonmembran, drei Lagen 3MM-Papier und einer dicken Lage Zellstoff in entsprechender Größe. Der Transfer vollzog sich über 4 h bis ü/N. Die Nylonmembran wurde 2 - 5 min in 5 x SSC gewaschen und 2 min auf 3MM-Papier getrocknet. Die RNA wurde durch UV-crosslinking und durch 2 h bei 80°C Backen fixiert. Sie wurde zur Northern-Hybridisierung eingesetzt.

Die Northern-Hybridisierung diente dem Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen. Auch hier basierte das System auf der Hybridisierung DIG-markierter Sonden mit der Zielsequenz (RNA statt DNA), welche auf einem Träger fixiert worden war.

Als Sonde diente DIG-markierte DNA. Die folgenden Schritte entsprachen denen der Southern-Hybridisierung. Dabei betrug die Hybridisierungstemperatur 47 - 50°C statt 42°C.

Die verwendeten Lösungen wurden vor der Verwendung mit DEPC zur RNase-Inaktivierung behandelt (1 ml DEPC (Fluka) pro Liter Lösung, ü/N bei 37°C) und autoklaviert. Die Schalen und Gefäße wurden bei 240°C mehrere Stunden erhitzt.

5.6 Analyse von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern

5.6.1 Präparation von pflanzlichen Proteinen

Das Pflanzengewebe wurde unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. 300 mg des pulverisierten Gewebes wurde mit 800 µl 1 x Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 100°C gekocht. Das Gefäß mit dem Homogenat wurde 1 h im Inkubatorblock bei RT geschüttelt. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation bei RT. 600 µl des Überstandes wurde mit 1.200 µl 100%igem Aceton versetzt. Die Fällung der Proteine vollzog sich bei -20°C für 1 h oder ü/N. Anschließend wurden die Proteine für 20 min bei 4°C und bei 14.000 Upm pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Aceton gewaschen und in 150 µl 6 M Harnstoff, 5% Eisessig unter Schütteln (>1 h) aufgenommen. Nicht-gelöste Proteine wurden durch kurze Zentrifugation abgetrennt. Die Proteine wurden bei -20°C gelagert.

5.6.2 ELISA zum Virusnachweis

Für den Virusnachweis wurde der TAS-ELISA angewendet. Hierfür wurden folgende Lösungen benötigt:

Beschichtungspuffer:	1,59 g Na ₂ CO ₃ 2,93 g NaHCO ₃ 0,2 g NaN ₃ ad 1,0 l bidest. H ₂ O, pH-Wert sollte 9,6 sein
Waschpuffer (PBST):	10 x PBS + Tween 20, 1 : 10 verdünnt
Probenpuffer:	Waschpuffer 20 g/l Polyvinylpyrrolidon (PVP) 10.000
Substratpuffer:	97 ml Diethanolamin 0,2 g NaN ₃ 700 ml H ₂ O pH mit HCl auf 9,8 einstellen und mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Konjugatpuffer:	Probenpuffer + 0,2% Eialbumin

Zum Beschichten der Mikrotiterplatte wurde das entsprechende Antiserum (AS0142 BLRV IgG) mit Beschichtungspuffer 1 : 500 verdünnt und davon je 100 µl in die Vertiefungen der Platte gefüllt. Die Platte wurde 2 - 4 h bei 37°C inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit PBST gewaschen. Von den zu testenden Blättern wurde ein Preßsaft hergestellt, der 1 : 30 mit Probenpuffer verdünnt wurde. Pro Probe wurden 100 µl in die Näpfe gefüllt. Die Platte wurde ü/N bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde wieder 3 x mit PBST gewaschen. Die Blockierungslösung wurde aus 2% Magermilch in 1 x PBS angesetzt. Hiervon wurden 250 µl in die Näpfe gefüllt und 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBST wurde eine 1 : 1.000 Verdünnung des weiteren Hüllprotein-spezifischen Antikörpers (BLRV-MAB 5G4) in PBS in die Näpfe gegeben. Die Platte wurde 2 h bei 37°C inkubiert. Wieder wurde 3 x mit PBST gewaschen. Für die Nachweisreaktion wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Maus-Kaninchen-Antikörper mit Konjugatpuffer 1 : 1.000 verdünnt. Von dieser Lösung wurden 100 µl in die Näpfe gefüllt und die Platte 2 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Farbreaktion mit je 100 µl 1 mg/ml p-Nitro-

phenylphosphat in Diethanolamin. Nach ca. 1 h konnte die optische Dichte bei 405 nm mit einem ELISA-Meßgerät ermittelt werden.

5.6.3 Subzelluläre Fraktionierung

Proteinfractionen der verschiedenen subzellulären Kompartimente konnten durch Adaptation einer Methode, welche von Niesbach-Klösigen et al. (1990) beschrieben worden war, gewonnen werden.

Extraktionspuffer:	100 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
	10 ml 1 M KCl
	5 ml 1 M $MgCl_2$
	100 ml Glycerin
	770 μ l 13 M β -Mercaptoethanol
	136 g Saccharose
	auffüllen auf 1 l

Das geerntete Blattmaterial wurde in einem Warren-Blender mit dem 10fachen Volumen (w/v) Extraktionspuffer ca. 1 min bei Stufe 5 homogenisiert. Das Homogenat wurde über einen Miracloth-Filter gegeben. Das Filtrat wurde bei 1.000 xg in einem Falcon-Röhrchen zentrifugiert. Das Pellet wurde als P1 bezeichnet und mit einer Lösung aus 1 ml 6M Harnstoff, 5% Essigsäure resuspendiert. Der Überstand wurde in einem Corex-Röhrchen bei 30.000 xg zentrifugiert. Das entstandene Pellet (P30) wurde ebenfalls in einem 1 ml 6 M Harnstoff, 5% Essigsäure gelöst. Der Überstand (S30) wurde mit einem doppelten Volumen Aceton gefällt, mit 70%igem Aceton gewaschen und das S30-Pellet mit der 6 M Harnstoff-Lösung aufgenommen. Das feste Material auf dem Miracloth-Filter wurde in ein Falcon-Röhrchen gefüllt und zweimal mit dem Extraktionspuffer mit 2% Triton X-100 gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand (ST) abgenommen, und das Pellet wurde mit 5 ml Laemmli-Puffer, welcher 9 M Harnstoff statt des Glycerins enthielt, 10 min gekocht.

5.6.4 Isolierung des P19,5k-Antigens

Die verwendete Methode wurde in ähnlicher Form in der Publikation von Niesbach-Klösigen et al. (1990) beschrieben.

M9CA-Medium:	7,5 g $Na_2HPO_4 \times H_2O$
	3 g KH_2PO_4
	0,5 g NaCl
	1 g NH_4Cl
	2 g casamino acids
	ad 980 ml mit H_2O .

Nach dem Autoklavieren wurden folgende sterile Stammlösungen hinzugegeben:

2 ml 1 M $MgSO_4$
1 ml 0,1 M $CaCl_2$
5 ml 80% Glycerin

Zur Minipräparation von Fusionsprotein wurde eine 0,5 ml E. coli ü/N-Kultur in 4,5 ml M9CA mit Ampicillin überführt. Bei einer OD_{600} von 0,4 - 0,5 wurde IPTG zu einer Konzentration von 1 mM zugegeben. Das Pellet aus 1 ml Kultur (4 h nach Induktion mit IPTG) wurde in 100 μ l 1 x Laemmli-Puffer 5 min bei 100°C aufgeköcht und 40 μ l in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde nach dem Lauf mit Coomassie Blau angefärbt.

Nach Überprüfung der richtigen Größe des exprimierten Proteins im Polyacrylamidgel wurden Maxi-Präparationen zur Gewinnung größerer Mengen des Fusionsproteins durchgeführt.

Es wurde eine 10 ml Übernacht-Kultur der rekombinanten Bakterien in LB-Medium mit Amp angezogen. 400 ml M9CA-Medium (1/10 Amp) wurde mit 4 ml der Übernacht-Kultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einem Rotationsschüttler. Bei einer OD_{600} von

ca. 0,5 erfolgte die Induktion mit IPTG (Zielkonzentration: 1 mM IPTG). Die Bakterien wuchsen weitere 4 h. Anschließend wurden Inklusionskörper (inclusion bodies) aus den Bakterien isoliert.

Isolierung der Inklusionskörper

Lysispuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl;
1 mM DDT; 0,5 mg/ml Lysozym

Waschpuffer I: 10 mM Tris-HCl pH 7,8; 1 mM EDTA; 0,4 M NaCl;
1 mM DDT; 0,5% NP 40

Waschpuffer II: 10 mM Tris-HCl pH 7,8; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl;
1 mM DDT; 0,5% NP 40

Waschpuffer III: Waschpuffer II ohne NP 40

Die Bakterienkultur wurde 30 min bei 4.000 xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 ml 50 mM Tris-HCl pH 8,0 gewaschen und erneut wie oben zentrifugiert. Zur Lyse der Bakterien wurde 1/10 Vol Lysispuffer zugefügt. Das Gefäß wurde 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Lösung eingefroren und wieder bei 37°C aufgetaut. Die Lösung wurde in kleineren Aliquots (ca. 10 ml) so lange sonifiziert, bis sie dünnflüssig war.

Das Pelletieren der Inklusionskörper erfolgte durch Zentrifugation bei 10.000 xg bei RT. Die Inklusionskörper wurden in den folgenden Schritten gründlich aufgereinigt. Dazu wurde das Pellet in Waschpuffer I mit einem Ultra-Turrax resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Dieses Waschen wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit Waschpuffer II gewaschen (wie oben). Im letzten Schritt wurde das Pellet einmal mit Waschpuffer III gewaschen (wie oben).

Das Protein aus den Inklusionskörpern konnte durch den His-tag über eine Affinitätsaufreinigung mit Ni-NTA-Säulenmaterial der Firma Qiagen weiter aufgereinigt werden. Das Pellet wurde dazu in einem Guanidinium-Puffer aufgenommen, der im Protokollheft mit dem Titel „Der Expressionist“ beschrieben war. Alle weiteren Schritte der Aufreinigung erfolgten gemäß Anweisungen des Qiagen-Protokolls.

5.6.5 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Für die Gewinnung von Antisera wurden Kaninchen herangezogen. Die Tiere hatten ein Mindestalter von sechs Monaten und wurden im Kaninchenstall der BBA gehalten.

Bei der Immunisierung wurde eine Wasser-in-Öl Emulsion aus 1 ml (ca. 300 µg Protein) aufgereinigtem Antigen und 1 ml Freund's Adjuvans (Difco Laboratories) in die Hinterschenkel injiziert. Die erste Immunisierung erfolgte mit komplettem Freund's Adjuvans, die folgenden mit inkomplettem Freund's Adjuvans. Zur Erhöhung des Antikörpertiters wurde alle zwei bis drei Wochen eine „booster“ Injektion ebenfalls mit inkomplettem Freund's Adjuvans durchgeführt. Sie wurden mit ca. 200 µg aufgereinigtem Antigen durchgeführt.

10 ml Blut wurden ca. 10 Tage nach der zweiten Immunisierung und fortlaufend im Abstand von 2 Wochen aus der lateralen Ohrvene entnommen. Das Blut wurde einige Stunden bei RT und anschließend ü/N bei 4°C stehengelassen, damit sich der Blutkuchen absetzen konnte. Das antikörperhaltige Serum wurde am folgenden Tag dekantiert und zur weiteren Aufreinigung in 15-ml-Falconröhrchen 30 min bei 3.500 xg zentrifugiert. Zur besseren Haltbarkeit wurde Natriumazid zu einer Endkonzentration von 0,02% dazugegeben. Die Rohseren wurden bei 4°C aufbewahrt.

5.6.6 Dot blot-Test

Die Seren der verschiedenen Blutentnahmen wurden in einem Tropfentest getestet. Dazu wurden auf eine Nitrocellulose-Membranstreifen an markierten Stellen Verdünnungsreihen des Antigens in 1 µl Volumen aufgetropft und getrocknet. Die Membran wurde in einer zweistündigen Inkubation mit 2% Magermilch in 1 x PBS geblockt und anschließend die Streifen einer Verdünnungsreihe mit den Seren 1 h inkubiert. Die Seren wurden dazu in drei

Verdünnungen (1 : 50, 1 : 200 und 1 : 500) mit 1 x PBS verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte eine einstündige Inkubation mit Anti-Kaninchen-Maus-Antikörper-AP-Konjugat (1 : 1.000 verdünnt in 1 x PBS) bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Bindung der AP-markierten Antikörper durch Inkubation der dot blot-Streifen mit NBT/X-Phosphat in Substratpuffer nachgewiesen.

5.6.7 Western-Blot-Analyse

Zur Analyse bzw. zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt.

Im oberen großporigen Sammelgel wurde das anfängliche Proteingemisch zu einer scharfen Zone konzentriert, im nachfolgenden engporigen Trenngel wurden die durch SDS denaturierten und negativ geladenen Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Probenpuffer (4fach):	4 ml 1M Tris-HCl pH 6,8 8 g SDS 40 ml Glycerin 4 g DTT 200 µl 10% Bromphenolblau
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
PAA-Stammlösung:	30% Acrylamid, 2,7% Bisacrylamid; wurde filtriert u. entgast
Trenngel-Überschichtungspuffer:	25 ml Trenngelpuffer 1,0 ml 10% SDS; mit dest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen
Elektrophoresepuffer:	12 g Tris 57,6 g Glycin 40 ml 10% SDS; mit dest. H ₂ O auf 4 Liter auffüllen.

Die Elektrophorese fand mit einer Apparatur (SE 250 Mighty Small II) der Firma Hoefer (Pharmacia) statt. Die Durchführung orientierte sich an dem mitgelieferten Instruktionsheft. Es wurden diskontinuierliche Gele benutzt, die aus 13,5%igen oder 15%igen Trenngelen bestanden, über die 4%ige Sammelgele gegossen wurden. Die Geltaschen wurden mit einem 10-er Kamm geformt. Folgende Lösungen wurde zur Herstellung der Trenngele verwendet:

	15% Acrylamidgel	13,5% Acrylamidgel
PAA-Stammlösung	10 ml	6,75 ml
Trenngelpuffer	5 ml	3,75 ml
10% SDS	200 µl	150 µl
H ₂ O	4,7 ml	4,425 ml
Lösungen kurz, vorsichtig mischen		
10% APS	150 µl	150 µl
TEMED	15 µl	15 µl
mischen		

Die Trenngel-Lösung wurde in den vorbereiteten Geltrog gegossen und vorsichtig mit dem Trenngel-Überschichtungspuffer bedeckt.

Das Sammelgel wurde wie folgt angesetzt:

Polyacrylamid-Stammlösung	1,34 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
10% SDS	100 µl
H ₂ O	6 ml
Lösungen kurz, vorsichtig mischen	
10% APS	80 µl

TEMED 8 µl
mischen.

Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Zuvor wurde der Übersichtungspuffer entfernt.

Die Elektrophorese fand bei konstant 40 mA, maximal 130 Volt statt. Während des Laufes wurde die Elektrophorese-Apparatur mit 4°C kaltem Wasser gekühlt.

Als Proteingrößen-, Lauf- und Blotmarker diente 5 µl des vorgefärbten low-weight-Markers der Firma BioRad. Nach Abschluß der Auftrennung wurden die Proteine im Gel entweder gefärbt oder auf eine Membran geblottet.

Die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im folgenden Schritt, analog zum Southern-Blot-Verfahren, auf einen Träger (PVDF-Membran) übertragen. Der Transfer erfolgte hierbei nicht über Kapillarkräfte, sondern durch Anlegen einer Spannung zwischen zwei Elektroden.

Der Transfer erfolgte mit einer „MultiBlot Elektrophorese Transfer Einheit“ der Firma LKB. Die Proteinübertragung auf eine PVDF-Membran (BioRad) wurde nach den Anweisungen des mitgelieferten Protokolls durchgeführt.

Blot-Puffer (10fach): 145 g Glycin
29 g Tris
auffüllen mit dest. H₂O auf 1Liter

1 x Blot-Puffer: 100 ml 10 x Blot-Puffer
200 ml Methanol
700 ml H₂O

Die Membran wurde in 100%igem Methanol für 2 s angefeuchtet und 15 min im 1 x Blot-Puffer zur vollständigen Durchfeuchtung inkubiert. Nach Vorschrift des Herstellers wurde das Gel mit der blasenfrei aufgelegten Membran zwischen Kunststoffgitter, Schwammtüchern und Filterpapieren im Blot-Puffer vorbereitet und in die Apparatur getaucht.

Der Elektroblot fand bei 56 V für 4 h in einem 4°C-Raum statt. Der Blot-Puffer wurde mit einem Magnetrührer ständig umgewälzt. Der erfolgreiche Transfer konnte durch die Übertragung des angefärbten Markers auf die Membran überprüft werden.

Nach dem Blotten wurde die Membran in 1 x PBS 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte eine Blockierung mit Magermilchpulver (5% in 1 x PBS) oder mit Blockierungsreagenz (1% in 1 x PBS) der Firma Boehringer Mannheim ü/N bei 4°C oder bei RT. Sollten die Proteine mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert werden, wurden die entsprechenden Laufbahnen voneinander getrennt. Die 1 - 2stündige Inkubation erfolgte bei RT in 1 x PBS mit Blockierungsmittel (s. o.). Danach wurden die Blots 3 x für 15 min mit 1 x PBS mit Blockierungsmittel gewaschen. Es folgte eine weitere Inkubation mit AP-konjugierten Kaninchen Anti-Maus-Antikörpern (1 : 1.000, in 1 x PBS verdünnt) oder Ziege Anti-Kaninchen-Antikörpern (1 : 1.000) für 1 bis 2 h. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen wie oben entfernt. Der Blot wurde in Puffer 3 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂, pH 9,5) 2 - 5 min equilibriert.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte entweder:

- a) mit der Farb-Substrat-Lösung, basierend auf Erzeugung eines violett-braunen Präzipitats auf der Membran, oder
- b) durch Autoradiographie - wie bei der Southern-Hybridisierung beschrieben.

Für a) wurden 45 µl NBT und 35 µl BCIP in 10 ml Puffer 3 verdünnt. Die NBT- und BCIP-Lösungen wurden dem Kit „DIG DNA Labeling and Detection“ (Boehringer Mannheim) entnommen. In dieser Lösung wurde der Blot im Dunkeln inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität (nach ca. 20 min) wurde der Blot mit destilliertem H₂O gespült.

Für b) wurde folgende Substratlösung angesetzt:

940 µl Puffer 3; 50 µl Nitro-Block (Serva);
10 µl Chemilumineszenz-Substrat; (CSPD oder CDP-Star, Serva)

In dieser Lösung wurde der Blot 5 min inkubiert und anschließend wurde, wie bei der Southern-Hybridisierung beschrieben, die Autoradiographie durchgeführt.

Zur irreversiblen Anfärbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blau wurden folgende Lösungen angesetzt:

Färbelösung: 1,25 g Coomassie Blau R250; 500 ml Methanol; 100 ml Eisessig, auffüllen auf 1 l mit dest. H₂O

Entfärbelösung: 100 ml Methanol; 70 ml Eisessig, auffüllen auf 1 l mit dest. H₂O

Das PAA-Gel wurde nach Ablauf der Elektrophorese für 1 - 4 h in die Färbelösung gelegt und leicht geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in der Entfärbelösung mehrere Stunden entärbt. Die prominenten Proteine erschienen als blaue Banden im Gel.

5.7 Analyse von Markergenen (nptII, gus)

5.7.1 Segregationsanalyse des nptII-Gens

Zum Nachweis der Transgenität sowie der Ermittlung des Spaltungsverhältnisses wurden ca. 20 - 50 Samen der geselbsteten, regenerierten Tabakpflanzen auf Kanamycin-haltigen Nährmedien ausgelegt. Zusätzlich empfahl es sich, an eine Stelle der Platte Samen von nicht-transformierten Tabakpflanzen zu geben. Die Samen wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen 2 min mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend 3 x in sterilem Wasser gespült. Als Nährmedium eignete sich MS-Medium mit Agar oder Wasser mit Agar. Das Kanamycin wurde in einer Konzentration von 100 - 200 mg/l hinzugefügt. Nach Inkubation der Platten in einem Pflanzenkulturschrank ließ sich der Versuch nach 2 - 3 Wochen auswerten. Die nicht-transgenen Keimlinge wurden weiß, die nptII-Gen-transgenen blieben jedoch grün.

5.7.2 GUS-Test

X-Gluc-Lösung: 50 ml 114 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄, pH 7,0
1 ml 0,5 M EDTA
8,25 g K₃[Fe (CN)₆]
10,55 g K₄[Fe (CN)₆]
30 - 35 mg X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Glucuronid) wurden zuvor in ca. 100 µl DMSO gelöst.

Blattstücke von GUS-transgenen Pflanzen wurden in Petrischalen oder 1,5 ml-Eppendorf-Gefäßen mit X-Gluc-Lösung bedeckt. Zur Infiltration des Substrats in das Gewebe wurde für 30 min ein Vakuum über den Gefäßen angelegt. Anschließend wurde im Dunkeln bei 37°C 24 h inkubiert. Das Gewebe wurde anschließend bis zur vollständigen Entfärbung des Blattgrüns mit 70% Ethanol gewaschen.

5.7.3 Detektion des GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur Detektion des GFP wurde das Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20 von Zeiss mit dem Filtersatz 09 benutzt (Anregungsfilter BP 450-490, Chromatic Beam Splitter FT 510, Langpassfilter LP 520 bzw. Bandpassfilter HQ 535/50x) verwendet. Bei Betrachtung von pflanzlichem Material unter dem Fluoreszenzmikroskop war zu beachten, daß bei der Benutzung des Langpassfilters LP 520 auch die Fluoreszenz des Chlorophylls in den Chloroplasten stark zu sehen war; diese konnte durch die Benutzung des Bandpassfilters HQ 535/50x ausgeschaltet werden. Die photographische Dokumentation erfolgte mit einem Zeiss Kameraaufsatz (Nr. 456005) mit 2,5 x Vergrößerung und einem Pentax P 30 T-Fotoapparat bzw. der Filmkassette MC80DX (Zeiss). Dazu wurden Kodak Ektachrome 64T-Filme verwendet, die eine geringe Empfindlichkeit, dennoch eine sehr hohe Auflösung besitzen. Die

Belichtungszeit lag zwischen 3 und 45 s. Für spätere Aufnahmen wurde auch der Fuji Diafilm sensia II (400 ASA) verwendet.

5.7.4 Detektion des GFP mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie (CLSM)

Für die konfokale Laserscanningmikroskopie wurde das Bio-Rad MRC-1024 confocal laser scanning imaging system verwendet. Ein Krypton/Argon Laser (15 mW; mit den Filtern UBHS und E2) erzeugte die Anregungswellenlänge von 488 nm.

5.8 Transformation von Pflanzen

5.8.1 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana tabacum*

MS-Medium:	4,6 g/l Basal-Salz-Mischung mit Vitaminen (Murashige & Skoog, bezogen von Duchefa); 20 g/l Saccharose, pH 5,7 mit KOH einstellen 8 g Agar bei Festmedium
T ₁ :	MS-Medium; 500 mg/l Cefotaxim; 100 mg/l Kanamycin; 1 mg/l BAP; 0,1 mg/l NAA
T ₂ :	MS-Medium; 250 mg/l Cefotaxim; 100 mg/l Kanamycin, 0,1 mg/l BAP
T ₃ :	MS-Medium; 250 mg/l Cefotaxim; 100 mg/l Kanamycin

Die Transformation von *N. benthamiana* und *N. tabacum* fand nach der Blattstück-Methode durch Cokultivierung mit rekombinanten *A. tumefaciens* statt (Horsch et al., 1985).

Verschiedene Agrobakterien-Stämme wurden zur Übertragung von Fremd-DNA verwendet. Die Anzucht erfolgte durch Inokulation von Einzelkolonien in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika. Die Bakterien wurden in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben mit 10 ml Flüssigmedium überführt und ü/N bei 200 UpM bis zum Wachstum einer dichten Kultur geschüttelt. Die OD₆₀₀ sollte bei 0,8 bis 1,0 liegen.

Zur Transformation wurden in vitro angezogene Pflanzen oder Gewächshaus-Pflanzen verwendet.

Aseptische in vitro Pflanzen ließen sich durch 2minütiges Sterilisieren der Samen in 70% Ethanol gewinnen. Das MS-Medium wurde in sterile Weck-Gläser gefüllt und mehrere Samen in diesen ausgelegt. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in einem Pflanzenkulturschrank bei 16 h Licht und 26°C. Gewächshauspflanzen mußten vor ihrer Verwendung zur Transformation einer Oberflächensterilisation unterzogen werden. Einige Wochen alten Tabakpflanzen wurden ca. 5 cm große Blätter entfernt und in 1,2%iger Natriumhypochlorid-Lösung (Roth) 20 min sterilisiert. Anschließend wurden die Blätter in sterilem H₂O mehrmals gründlich gewaschen, um Reste der Hypochlorid-Lösung zu entfernen. Von den aseptischen Blättern wurden die Mittelrippe und die Blattränder entfernt. Das restliche Blattmaterial wurde mit einer scharfen Skalpellklinge in ca. 0,5 x 0,5 cm große Stücke geschnitten. In Petrischalen (9 cm Ø) mit 10 ml MS-Medium (flüssig) wurden 10 dieser Quadrate mit der Blattoberseite nach unten gegeben. Zur Cokultivierung wurde 200 µl der Agrobakterien-Kultur zugefügt. Die Platten wurden mit Tesa-Krepp verschlossen und 2 Tage bei 26 °C im Dunkeln inkubiert.

Das Entfernen der Agrobakterien erfolgte durch reichliches Waschen (mindestens dreimal) der Blattstücke in flüssigem T₁-Medium oder sterilem Wasser. Die Blattscheiben wurden auf Filterpapier getrocknet und auf T₁-Medium zur Sproßinduktion mit der Blattoberseite nach unten ausgelegt. Die transformierten Pflanzenzellen wurden durch Verwendung von 100 mg/l Kanamycin selektiert.

Die Kulturbedingungen waren 26°C und 16 h Licht (erzeugt von einer Osram-Leuchtstofflampe L36 W/11, rY3, Tageslicht Lumilux). Nach ca. 4 Wochen entstanden Sprosse, welche zur Streckung in Gläser (z. B. Hipp-Babynahrung) mit T₂-Medium überführt wurden. Kleine Pflänzchen wurden zur Wurzelbildung in Weck-Gläser mit T₃-Medium gesetzt. Nachdem die regenerierten Sprosse Wurzeln gebildet hatten, konnten sie zur Samengewinnung in Erde überführt werden. Die Pflänzchen wurden dazu vorsichtig aus dem Medium gezogen, die Wurzeln mit lauwarmem Wasser vom verbleibenden Medium befreit und in einen Tontopf (ca. 10 cm Durchmesser) mit tonhaltiger Pflanzerde gesetzt. Über die Töpfe wurden Plastiktüten gestülpt. Nach einer Woche wurden die Tüten ständig weiter geöffnet, um die Pflanzen an die niedrigere Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus zu gewöhnen. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in einem Sicherheitsgewächshaus bei 24°C Tagestemperatur sowie einer Nachtabenkung auf 18°C mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h. *N. benthamiana*-Samen wurden in einem Eppendorfgefäß gesammelt, nachdem sich die Samenkapseln an der Spitze geöffnet hatten. Zur vollständigen Trocknung der Samen wurden die Gefäße eine Woche offen aufgestellt.

5.8.2 Transformation mit der Partikelkanone

Bei dieser Methode wurden sehr kleine, mit DNA beschichtete Wolframpartikel durch eine mit Helium getriebene Partikelkanone in intakte Pflanzenzellen hineingeschossen. Junge, mittelgroße *N. benthamiana*-Blätter wurden einzeln in mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Plastikpetrischalen gebettet oder die Blattstiele mit feuchter Watte umwickelt. Die Blätter wurden von Pflanzen geerntet, welche noch keine Blüten angesetzt hatten. 200 mg M 20 (~1 µm) Wolframpartikel wurden in 1 ml 100%igem Ethanol aufgenommen und 2 s sonifiziert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 s ohne Bremse bei 15.000 UpM zentrifugiert, 2 x mit sterilem, bidestilliertem Wasser gewaschen und in 1 ml sterilem 50%igem Glycerin resuspendiert. Die so vorbehandelten Partikel konnten bei -20°C aufbewahrt werden. 25 µl der vorbereiteten Partikelsuspension wurden in ein Eppendorfgefäß gefüllt und durch Vortexen resuspendiert. Im Anschluß daran wurde 8 µl DNA-Lösung (0,7 – 1 mg/ml) hinzugegeben und erneut gevortext. Hinzugefügt wurden 25 µl eiskaltes 2,5 M CaCl₂ und 10 µl 0,5 M Spermidin. Dieser Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 s ohne Bremse bei 1.500 UpM zentrifugiert und 58 µl vom Überstand abgenommen. Das Pellet wurde durch sanftes Vortexen resuspendiert und die Suspension zu jeweils 2,5 µl auf die flying discs gegeben. Anschließend wurde das Blattmaterial beschossen. Im vorliegenden Fall wurden Berstscheiben verwendet, die jeweils einem Druck von 400 psi standhielten. Bei Blattmaterial von *N. benthamiana* wurde wie folgt verfahren:

- 3 Berstscheiben (400 psi)
- 2 cm Abstand zum Makrocarrier
- 6 cm Abstand zum Zielgewebe
- 25 mm Hg Unterdruck

Nach dem Beschuß wurden die Blätter zur Expression des eingeführten Fremdgens für mindestens 16 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

5.8.3 Isolierung und Regeneration von Protoplasten

Lösungen:

Enzymlösung	1,2% Cellulase Onozuka R 10
	0,4% Macerocyme R 10
	in K ₃ -Medium

Die Enzymlösung wurde 20 min auf Eis gerührt, anschließend der pH-Wert auf 5,8 eingestellt und sterilfiltriert.

W ₅ :	154 mM NaCl 125 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O 5 mM KCl 5 mM Glucose pH 5,6-6,0 autoklavieren
K ₃ :	Mineralsalze
	Makrosalze
	134,0 mg/l (NH ₄) ₂ SO ₄
	250,0 mg/l NH ₄ NO ₃
	150,0 mg/l NaH ₂ PO ₄
	2.500,0 mg/l KNO ₃
	900,0 mg/l CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	250,0 mg/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	37,3 mg/l Fe NaEDTA
	Mikrosalze
	0,75 mg/l KJ
	3,0 mg/l H ₃ BO ₃
	10,0 mg/l MnMoO ₄ x H ₂ O
	0,25 mg/l Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
	0,025 mg/l CuSO ₄ x 5 H ₂ O
	0,025 mg/l CoCl ₂ x 6 H ₂ O
	2,0 mg/l ZnSO ₄ x 7H ₂ O
	weitere Zusätze
	100,0 mg/l myo-Inosit
	1,0 mg/l Nicotinsäure
	10,0 mg/l Thiamin HCl
	1,0 mg/l Pyridoxin HCl
	Hormone
	0,1 mg/l 2,4 D
	1,0 mg/l NAA
	0,2 mg/l BAP
	pH 5,8

Zur Gewinnung von Protoplasten konnte Blattmaterial sowohl aus dem Gewächshaus als auch aus in vitro-Kulturen verwendet werden, wobei Gewächshausmaterial zunächst in 1,2% Hypochlorid sterilisiert werden mußte.

Zunächst wurden die Blattmittelrippen entfernt, die Blätter in ca. 0,5 mm² große Stücke geschnitten. 10 ml der Enzymlösung wurde in eine 9-cm-Petrischale gegeben und die Blattstücke mit der Blattunterseite vorsichtig in Kontakt mit der Lösung gebracht. Anschließend wurden die Ansätze ca. 16 h bei 24°C im Dunkeln inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Platten sanft geschüttelt, um sämtliche Protoplasten aus dem verbleibenden Blattgewebe zu lösen. Zur Abtrennung von noch intaktem Blattmaterial wurde die Suspension über eine Nylonmembran (Porengröße 0,45 µm) filtriert. Das Filtrat wurde in Plastikröhrchen überführt und 10 min bei 600 UpM zentrifugiert. Die an der Oberfläche schwimmenden Protoplasten wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen, in ein neues Röhrchen mit 8 ml W5-Medium gegeben und anschließend 5 min bei 600 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 × mit W5-Medium gewaschen und in 1 ml W5-Medium aufgenommen. Die Protoplastensuspension wurde in einer 6-cm-Petrischale mit 4 ml K3-Medium gemischt. Zur Regeneration wurden die Protoplasten bei 24°C im Dunkeln inkubiert.

6 Ergebnisse

6.1 Hüllproteingen-Klonierungsstrategie für das pflanzliche Transformationssystem

Frau Birgitt Prill klonierte die Hüllproteingen-Sequenz des BWYV in den pflanzlichen Expressionsvektor pRT101 (Töpfer et al., 1987). Die Hüllproteinsequenz lag eingebettet zwischen dem Promoter und der Terminationssequenz des 35S-Gens des CaMV. Die Expressionskassette wurde flankiert von zwei HindIII-Restriktionsschnittstellen (Prill et al., 1988). Ein Schema des Vektors wird in dem Bild 7 A gezeigt. Die Sequenz der Expressionskassette HindIII CP wird im Anhang gezeigt.

Das HindIII-Fragment aus dem Plasmid pRT CP wurde in die HindIII-Schnittstelle des Vektors pLX PAT GUS (unveröffentlicht) kloniert. Dieser Vektor basiert auf den Vektor pLX 222 (Landsmann et al., 1988). Das Ergebnis war das Plasmid pLX CP (Bild 7 B).

Anschließend erfolgte eine in vitro-Mutagenese mit dem Ziel, zwei mutierte Hüllproteingene mit der Bezeichnung CP-VPg und NLATCP zu erzeugen. In der ersten Mutagenese sollte das Leseraster des 19,5k-Gens ausgeschaltet werden (CP-VPg); in der zweiten beide Leseraster (NLATCP).

Zur Isolierung von ssDNA für die in vitro-Mutagenese mußte die CP-Expressionskassette in einen Bluescriptvektor kloniert werden. Der Vektor pSK(-) wurde mit HindIII geöffnet und das HindIII-CP-Fragment aus dem Plasmid pRT CP eingeführt. Das rekombinierte Plasmid pSK(-) CP konnte zur in vitro-Mutagenese mit folgenden Oligonukleotiden eingesetzt werden.

19,5k EclXI 5' - CAA TCA ACG **GCC** GAA G - 3'

Mit diesem Oligonukleotid wurde das Startkodon des 19,5k-Gens zerstört (ACG statt ATG; unterstrichen). Gleichzeitig konnte die erfolgreiche Mutagenese durch die Einführung einer Ecl XI-Restriktionsschnittstelle (fettgedruckt) überprüft werden.

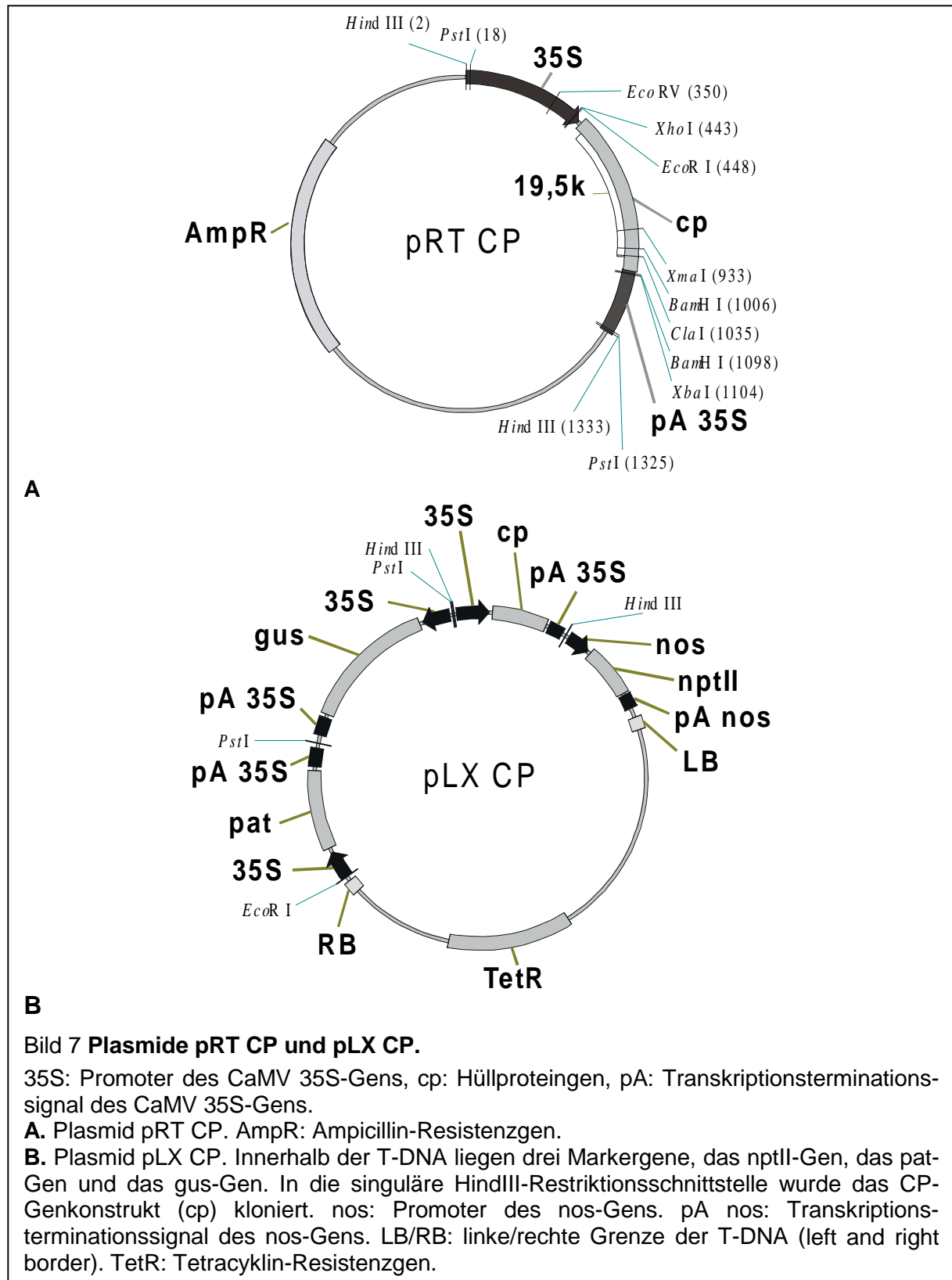
19,5k Stop 5' - CTC AGC CAG TAG TTG TAG - 3'

Zwei Stopkodone (TAG; unterstrichen) wurden in das 19,5k-Leseraster eingeführt. Die Aminosäuresequenz des Hüllproteins wurde nicht verändert.

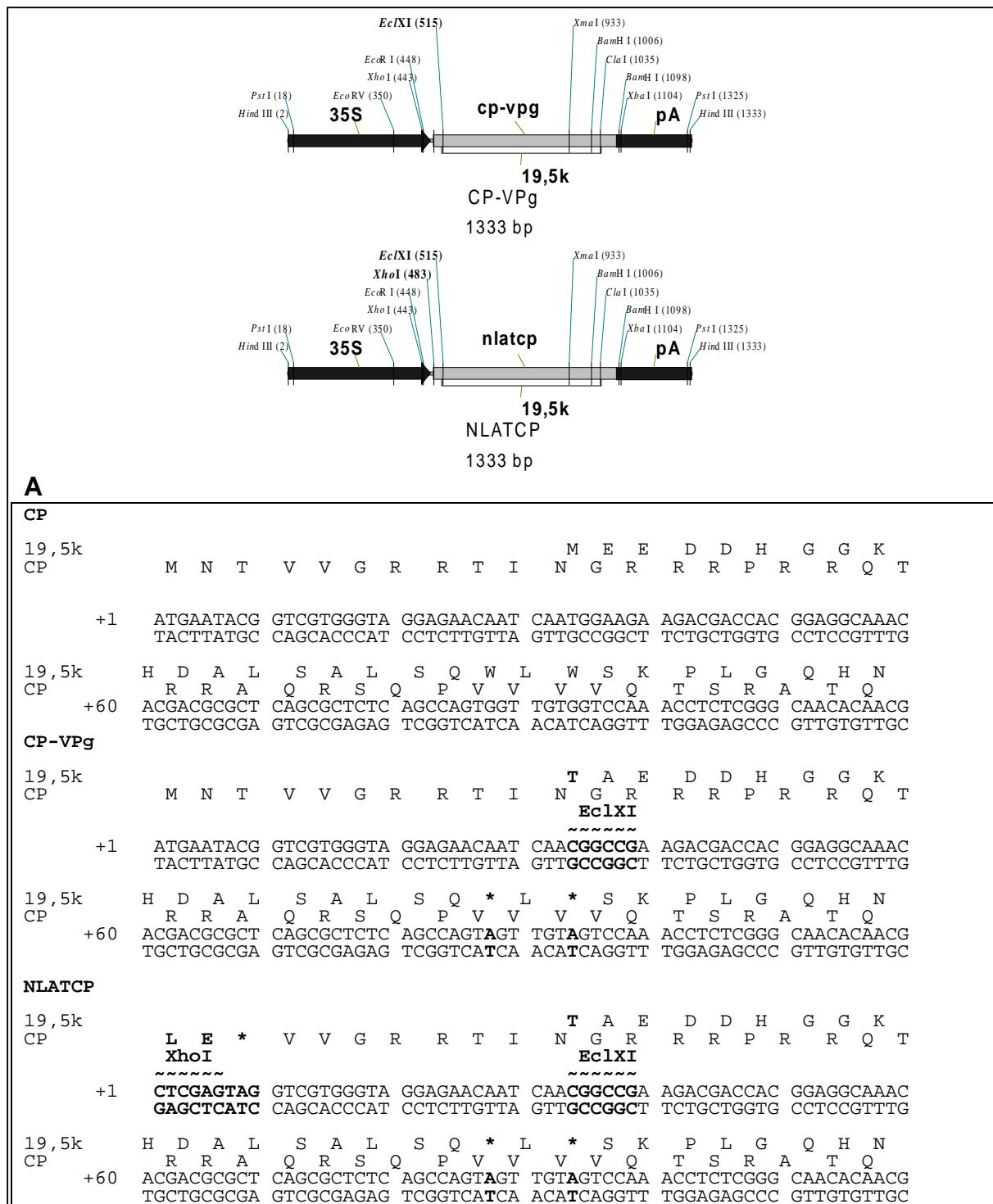
CP Stop 5' - G CCG TTA CTC **GAG** TAG GTC GTG GGT AGG - 3'

Dieses Oligonukleotid zerstörte das native Hüllproteinstartkodon (CTC statt ATG; unterstrichen) und führte ein Stopkodon ein (TAG; doppelt unterstrichen). Es wurde eine neue XhoI-Restriktionsschnittstelle (fettgedruckt) geschaffen.

Im ersten Schritt der in vitro-Mutagenese wurden die Oligonukleotide „19,5k EclXI“ und „19,5k Stop“ verwendet. Die aus der in vitro-Mutagenese gewonnenen Plasmide wurden in E. coli NM522 transformiert. Nach Plasmid-DNA Minipräparation und EclXI-Restriktionsverdau wurden mutmaßliche Mutanten ausgewählt. Durch DNA-Sequenzierung des mutierten 5'-Bereichs konnte die erfolgreiche in vitro-Mutagenese in einigen Klonen bestätigt werden. Das erhaltene Plasmid pSK(-) CP-VPg wurde einer zweiten in vitro-Mutagenese unterzogen, dabei wurde das Oligonukleotid „CP-Stop“ verwendet. Mehrere Klone wurden durch das Vorhandensein einer neuen XhoI-Schnittstelle in den Plasmiden ausgewählt. Die rekombinanten Plasmide pSK(-) NLATCP wurden sequenziert. Eine schematische Übersicht der CP-VPg und NLATCP-Konstrukte gibt das Bild 8 und stellt die durch in vitro-Mutagenese erzeugte Sequenzveränderung dar. Die Sequenz der CP-VPg und der NLATCP-Expressionskassette wird im Anhang gezeigt. Aus den Plasmiden pSK(-) CP-VPg und pSK(-) NLATCP wurde das HindIII-Fragment isoliert und in die HindIII-Schnittstelle des binären Vektors pLX PAT GUS eingeführt.



Die Agrobakterien-vermittelte Transformationsmethode stellte das geeignete Werkzeug zur Übertragung der Expressionskassetten CP, CP-VPg und NLATCP in *N. benthamiana* dar. Die binären Vektoren pLX CP, pLX CP-VPg und pLX NLATCP wurden durch Elektroporation in *A. tumefaciens* EHA 101 (Hood et al., 1986) eingeführt. Die Integrität der T-DNA wurde durch Plasmid-DNA-Minipräparationen überprüft.

**B****Bild 8 Expressionskassetten CP-VPg und NLATCP.**

A. Schema der Expressionskassetten CP-VPg und NLATCP. 35S: Promoter des CaMV 35S Gens; cp-vpg: Hüllproteingen mit nicht-translatierbarem 19,5k-Gen; nlatcp: nicht-translatierbares Hüllproteingen und 19,5k-Gen; pA: Transkriptionsterminatorssignal des CaMV 35S-Gens.

B. Vergleich der 5'-Sequenz der klonierten Hüllproteingen-Konstrukte. Die Restriktionschnittstellen (XhoI und EclXI) sind durch die in vitro-Mutagenese eingeführt worden. Fettgedruckte Buchstaben deuten auf mutierte Nukleinsäuren bzw. Aminosäuren hin. CP-VPg: das Startkodon des 19,5k-Gen-Leserasters wurde zerstört (M->T), die Sterne markieren die Position zweier Stopkodone. NLATCP: basiert auf CP-VPg, zusätzlich wurde das CP-Startkodon zerstört (MNT->LE*).

6.2 Nachweis der Expression der Hüllproteingen-Konstrukte

In den transgenen Pflanzenlinien sollte der Nachweis der Integration und Expression der Fremdgene geführt werden.

Die transgenen Pflanzen wurden nach der Regeneration auf einem kanamycinhaltigen Selektionsmedium in Erde gepflanzt und geselbstet. Die Samen dieser Linien wurden sterilisiert und auf kanamycinhaltigem Medium *in vitro* selektiert. Es sollten sich nur Pflanzen entwickeln, welche das Kanamycin-Resistenzgen exprimierten. Obwohl sich die Hüllproteingen-Konstrukte und das *nptII*-Gen auf einer T-DNA befanden und somit gemeinsam in das Pflanzengenom integriert worden sein sollten, wurde dies für die Hüllproteingen-Konstrukte explizit überprüft. Ebenso wurde die Expression der Hüllproteingene, also die Bildung der mRNA und deren Translation, überprüft.

Für das CP-Konstrukt wurden die Linien mit den Nummern 13, 17, 19, 28, 29, 30, 31, 32, 56, 77, 81 und 84 untersucht.

Für das CP-VPg-Konstrukt wurden die Linien mit den Nummern 60, 98, 228, 238, 247, 267, 268, 300, 305 und 306 untersucht.

Für das NLATCP-Konstrukt wurden die Linien mit den Nummern 78, 94, 172, 175, 220, 261, 269, 270, 278, 286, 302 und 303 untersucht.

Dafür wurde aus Blättern von 3 - 5 auf kanamycinhaltigem Selektionsmedium angezogenen Nachkommen der verschiedenen Linien die genomische DNA, die RNA und die Proteine isoliert.

Auf DNA-Ebene wurde der Nachweis der Integration des *nptII*-Gens mit Hilfe der polymerase chain reaction (PCR) geführt. Der Nachweis der Hüllproteingen-Konstrukte erfolgte durch eine Southern-Blot-Analyse.

Für den *nptII*-Gen-Nachweis durch die PCR wurden 0,5 µl der isolierten genomischen DNA verwendet. Pro Ansatz erfolgte die Reaktion in einem Endvolumen von 40 µl. Für alle Ansätze wurde ein gemeinsamer Reaktionsmix vorbereitet, der sämtliche Bestandteile -außer

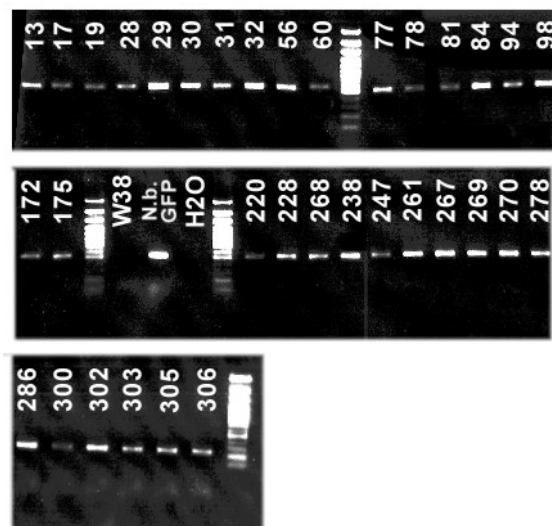
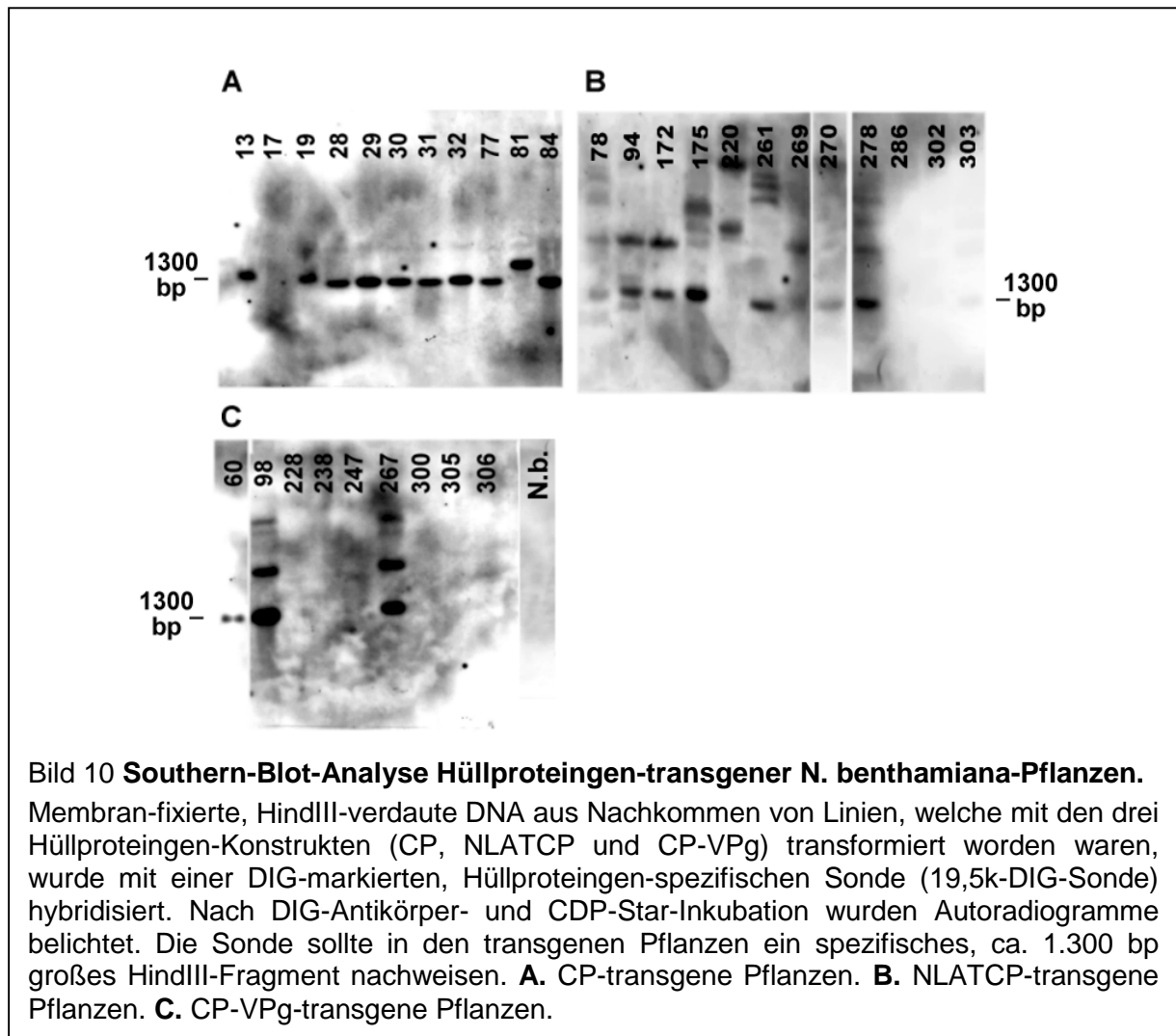


Bild 9 PCR mit *nptII*-spezifischen Primern zum Nachweis des *nptII*-Gens in Hüllproteingen-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen.

Jeweils 10 µl eines PCR-Ansatzes wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und das Gel mit EtBr angefärbt. Als Größenstandard diente die 100 bp-Leiter (Plus) der Firma MBI. Die Banden liegen bei ca. 500 bp. Als Positivkontrolle diente die genomische DNA einer GFP-transgenen Pflanze, als Negativkontrolle Wasser und die DNA einer *N. tabacum*-Pflanze (W38).



der DNA - enthielt. Die DNA und der Reaktionsmix mit den nptII-Primern wurden in 0,5-ml-PCR-Reaktionsgefäßen gemischt und mit einem speziellen PCR-Wax überschichtet. Für die Amplifikation pflanzlicher DNA wurde folgendes Programm verwendet: Denaturierung 1 min, 94°C; Annealing 1 min, 55°C; Elongation 1 min, 72°C; 27 Zyklen. Als Negativkontrollen dienten die DNA einer *N. tabacum*-Pflanze und ein Ansatz mit Wasser. Als Positivkontrolle wurde die DNA einer GFP (green fluorescent protein)-exprimierenden *N. benthamiana*-Pflanze verwendet. Zur Transformation dieser Pflanze war ein Vektor verwendet worden, welcher neben dem gfp-Gen auch das nptII-Gen in der T-DNA enthielt. Bild 9 zeigt das Ergebnis des durchgeführten PCR-Versuches. Die Kontrollen zeigten das erwartete Ergebnis: und zwar keine Banden in der Wasser- und der *N. tabacum*-Probe sowie eine ca. 500 bp große Bande in der GFP-transgenen *N. benthamiana*-Pflanze. Die Größen der DNA-Banden in den untersuchten Pflanzen entsprachen der errechneten Größe des PCR-Fragmentes von ca. 500 bp. In allen transgenen Pflanzen wurde das nptII-Gen nachgewiesen.

Zum Nachweis der Integration der Hüllproteingene wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Die Linien 56 und 268 wurden in dieser Analyse nicht getestet. Dazu wurde die genomische DNA aus ca. 100 mg Blattmaterial der transgenen Pflanzenlinien mit HindIII verdaut und anschließend in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran wurde der Nachweis mit einer 19,5k-DIG-markierten Sonde geführt. Die Verwendung der 19,5k-Gen-Sonde war möglich, da die Sequenz des 19,5k-Gens innerhalb des Hüllproteingens liegt. Die DIG-markierte Sonde war durch eine PCR hergestellt worden. Als Negativkontrolle diente die DNA einer nicht-transgenen *N. benthamiana*-Pflanze.

Bild 10 zeigt das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse. In der Negativkontrolle ließ sich keine Bande nachweisen (Bild 10, äußerste rechte Spur). Für die Linien mit dem CP-Konstrukt ließ sich in fast allen Spuren eine Bande bei ca. 1.300 bp detektieren (Bild 10, Blot A). In der Spur der Linie 17 wurde keine Bande nachgewiesen. Die Bande der Linie 81 lag oberhalb der erwarteten Größe von 1.300 bp. Der Blot B (Bild 10) zeigt das Ergebnis für die NLATCP-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen. In den meisten Spuren wurden mehrere Banden detektiert. Neben der erwarteten Bande bei ca. 1.300 bp traten noch weitere Banden oberhalb davon auf. In den Linien 220, 286 und 302 konnte kein NLATCP-Konstrukt nachgewiesen werden. In der Analyse der CP-VPg-Pflanzen ließ sich in den drei Linien 60, 98 und 267 das Konstrukt nachweisen. Die Spuren dieser Linien zeigten eine Bande bei 1.300 bp. In den Linien 98 und 267 traten weitere Banden oberhalb der erwarteten Bande auf. In der Linie 306 wurde nur eine Bande oberhalb von 1.300 bp festgestellt.

Der Nachweis der Synthese der Hüllprotein-mRNA wurde mit der Northern-Blot-Analyse geführt. Die Linien 56, 268 und 278 wurden in dieser Analyse nicht getestet. Die isolierte RNA aus den entsprechenden Nachkommen der zu testenden Linien wurde elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zum Nachweis der spezifischen mRNA wurde die 19,5k-DIG-markierte Sonde verwendet. Als Kontrolle diente die RNA aus einer BWYV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze und einer nicht-transgenen *N. benthamiana*-Pflanze.

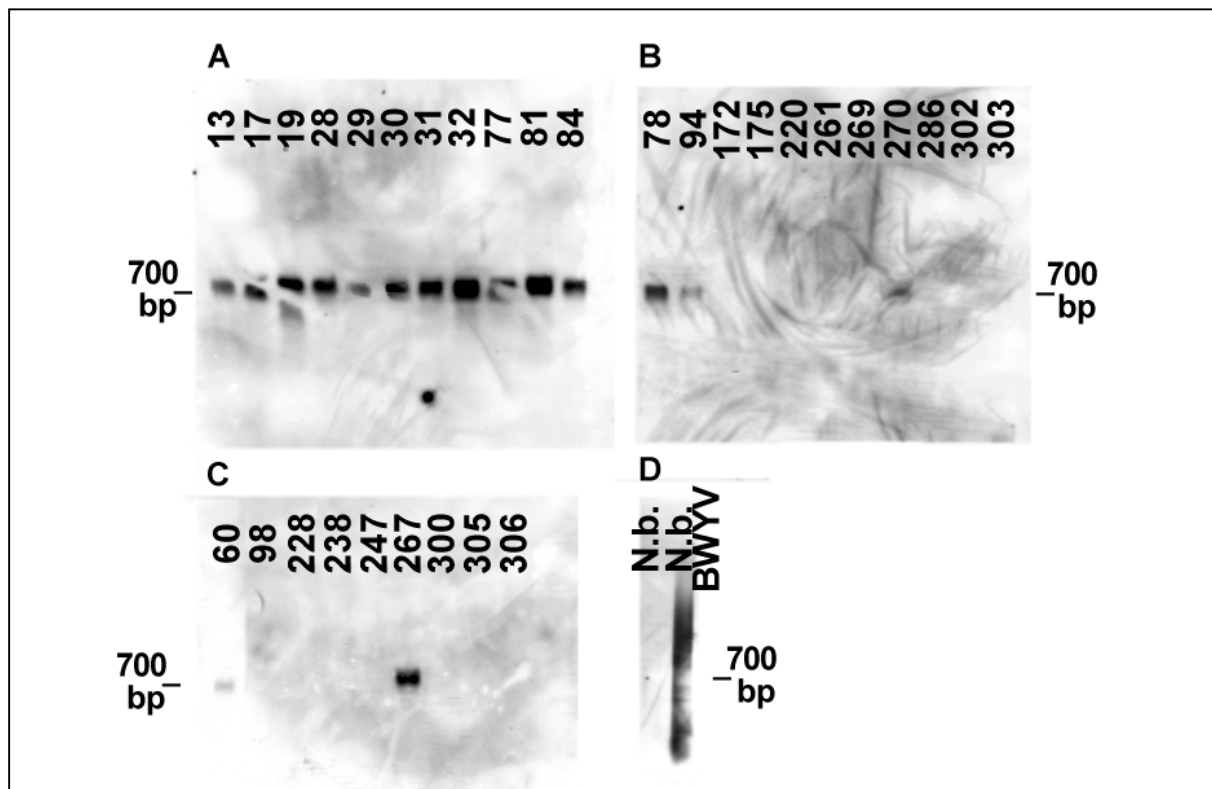


Bild 11 Northern-Blot-Analyse Hüllproteingen-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen.

Membran-fixierte Gesamt-RNA aus Nachkommen von Linien, welche mit den drei Hüllproteingen-Konstrukten (CP, NLATCP und CP-VPg) transformiert worden waren, wurden mit einer DIG-markierten, Hüllproteingen-spezifischen Sonde (19,5k-DIG-Sonde) hybridisiert. Nach DIG-Antikörper- und CDP-Star-Inkubation wurden Autoradiogramme belichtet. Die Sonde sollte in den transgenen Pflanzen eine spezifische, ca. 700 bp große Hüllproteingen-mRNA nachweisen. **A.** CP-transgene Pflanzen. **B.** NLATCP-transgene Pflanzen. **C.** CP-VPg-transgene Pflanzen. **D.** Negativkontrolle (RNA aus einer nicht-transgenen *N. benthamiana*-Pflanze) und Positivkontrolle (RNA aus einer BWYV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze).

Bild 11 zeigt das Ergebnis der Northern-Blot-Analyse. In der Negativkontrolle ließ sich keine Bande nachweisen. Die Positivkontrolle (N.b./BWYV) zeigte zahlreiche Banden (Blot D). In Blot A der CP-transgenen Pflanzen zeigten alle Linien die Bildung der CP-mRNA. Die Größe der nachgewiesenen mRNA-Moleküle (ca. 700 bp) steht in guter Übereinstimmung mit den zu erwartenden Werten. Sie ergibt sich aus ca. 600 transkriptionsbedingten Nukleotiden und einer unterschiedlich langen Poly(A)-Sequenz. Die Linie 81, welche in der Southern-Blot-Analyse eine Bande oberhalb von 1.300 bp zeigte, besaß ebenfalls eine Bande in der erwarteten Größe. Für die Linien mit dem NLATCP-Konstrukt (Blot B) wurde in drei Spuren der Linien 78, 94, 270 und 303 eine Bande bei ca. 700 bp erkannt. In der Analyse der CP-VPg-transgenen Pflanzen zeigten die Linien 60 und 267 die Bildung der mRNA.

Für den Nachweis des Hüllproteins wurden eine Proteinextraktion und Proteinbestimmung durchgeführt. Dabei wurden Linien ausgewählt, in welchen eine starke Bande in der Northern-Blot-Analyse nachweisbar war. Im ELISA sollte überprüft werden, ob das Hüllprotein in den transgenen Pflanzen gebildet wird. Der ELISA wurde im Triple-Sandwich-Verfahren (TAS-ELISA) durchgeführt. In allen Proben war die Proteinkonzentration auf 56 µg/µl eingestellt worden. Im ELISA wurden 100 µl Proteinextrakt eingesetzt. Die Hüllprotein-spezifischen Antikörper wurden von der DSMZ/Abteilung Pflanzenviren in Braunschweig zur Verfügung gestellt. Als Kontrollen dienten eine BWYV-infizierte und eine nicht-infizierte *N. benthamiana*-Pflanze.

Tabelle 6 zeigt das Ergebnis des ELISA. In den nicht-infizierten Pflanzen sowie in den transgenen Pflanzen ließ sich kein Hüllprotein nachweisen. In der BWYV-infizierten Pflanze konnte die Bildung des viruskodierten Hüllproteins gezeigt werden.

Tabelle 6 ELISA-Werte der Hüllproteingen-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen mit Hüllprotein-spezifischen Antikörpern.

Der ELISA wurde im Triple-Sandwich-Verfahren durchgeführt. Im ELISA wurden 100 µl Proteinextrakt aus den Nachkommen der genannten Linien eingesetzt. Die Hüllprotein-spezifischen Antikörper wurden von der DSMZ/Abteilung Pflanzenviren in Braunschweig zur Verfügung gestellt. Als Kontrollen dienten eine BWYV-infizierte *N. benthamiana*-Pflanze und eine nicht-infizierte *N. benthamiana*-Pflanze.

Linie	OD 405	Linie	OD 405
CP-19	-0,008	CP-VPg-267	-0,010
CP-28	-0,007	NLATCP-78	-0,006
CP-31	-0,002	NLATCP-94	-0,002
CP-32	-0,006	NLATCP-270	0,000
CP-81	-0,008	N.b.- nicht-inf	-0,002
CP-84	-0,005	N.b.- BWYV-inf.	2,483
CP-VPg-60	-0,010	blank	-0,001

Bei den Hüllproteingen-Konstrukten CP-VPg und NLATCP sollte überprüft werden, ob sie in transgenen Pflanzen noch die Bildung des P19,5k erlauben, und entsprechend, ob in CP-transgenen Pflanzen das P19,5k gebildet wird. Der Nachweis wurde in der Western-Blot-Analyse mit P19,5k-spezifischen Antikörpern geführt. Die P19,5k-Antikörper wurden aus Kaninchen, welchen in vitro synthetisiertes P19,5k gespritzt worden war, gewonnen (zur Gewinnung dieses Antikörpers siehe 6.4). Nachdem die Proteine aus ausgewählten transgenen Linien elektrophoretisch getrennt worden waren, wurden sie auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit den P19,5k-Antikörpern (1 : 500) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit AP-konjugierten Anti-Kaninchen Maus-Antikörpern (1 : 1.000) und der anschließenden Umsetzung eines Farbsubstrats. Als Kontrolle diente eine Proteinpräparation aus einer BWYV- und einer nicht-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze.

Bild 12 zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse. Die Proben zeigten eine unspezifische Reaktion einem ca. 46 kDa großem Protein. Diese Banden traten bei allen Proben auf. Bei der Probe aus der BWYV-infizierten Pflanze erscheint zusätzlich eine Bande bei ca. 22 kDa. Diese entspricht der in der Literatur beschriebenen Größe für das P19,5k (Veidt et al., 1988). In

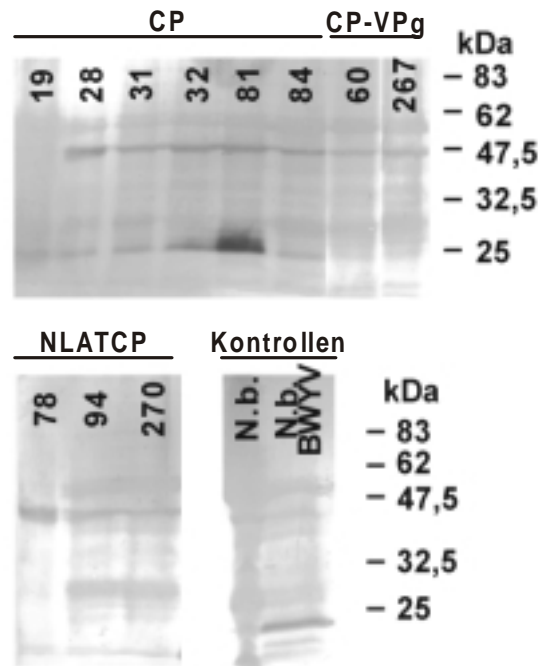


Bild 12 Western-Blot-Analyse Hüllproteingen-transgener *N. benthamiana*-Pflanzen.

Membran-fixiertes Gesamtprotein aus Nachkommen von Linien, welche mit den drei Hüllproteingen-Konstrukten (CP, CP-VPg und NLATCP) transformiert worden waren, wurden mit P19,5k-spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antikörpern inkubiert. Nach Inkubation mit AP-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörpern wurde der Blot mit NBT und BCIP behandelt. Der P19,5k-Antikörper sollte in den transgenen Pflanzen ein spezifisches, ca. 22 kDa großes Protein nachweisen. Als Negativkontrolle diente Gesamtprotein aus einer nicht-transgenen Pflanze, als Positivkontrolle Gesamtprotein aus einer BWYV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze. In den CP-transgenen Pflanzen konnte die Bildung des P19,5k gezeigt werden.

allen untersuchten CP-transgenen Linien (19, 28, 31, 32, 81 und 84) läßt sich ebenfalls eine Bande auf dieser Höhe detektieren. In den beiden CP-VPg-Proben (60 und 267) sowie in den drei NLATCP-Proben (78, 94 und 270) ließ sich keine Bande auf dieser Höhe entdecken. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß wie erwartet nur in den CP-transgenen Pflanzen das P19,5k gebildet wird. Die Mutation(en) in den anderen beiden Konstrukten am Translationsstart des 19,5k-Gens verhindern offensichtlich die Bildung des P19,5k.

In der Tabelle 7 sind die Ergebnisse der molekularen Analysen zusammengefaßt. In der Tabelle enthalten sind auch der GUS-Test und die Segregationsanalyse. Die nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation regenerierten Pflanzen sollten bezüglich der T-DNA heterozygot sein. In der ersten Nachkommenschaftsgeneration, die durch Selbstbestäubung entstanden war, sollten nach der 2. Mendelschen Regel Individuen im Verhältnis 1 : 2 : 1 - bezogen auf die T-DNA - auftauchen. Wurde genau eine T-DNA und somit ein nptII-Gen übertragen, so sind im Idealfall $\frac{3}{4}$ der Keimlinge kanamycinresistent. Die Nachkommen der Linien auf dem Selektionsmedium (200 mg/l Kanamycin) spalteten in grüne und weiße Keimlinge auf. Dieses Verhältnis wurde bestimmt und mit den erwarteten Werten für eine, zwei und mehr Genkopien verglichen. Bei einem Verhältnis von 3 : 1 wurde geschätzt, daß nur eine T-DNA-Kopie vorliegt, bei 9 : 1 zwei Kopien usw. Zur Kontrolle der Selektion wurden jeweils Samen von nicht-transgenen Pflanzen an eine separate Stelle des verwendeten Mediums gegeben. Ebenfalls wurde von den Nachkommen ein GUS-Test gemacht. Dazu wurden kleine Blattstücke ü/N mit X-Gluc-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Blätter mit 70% Ethanol 24 h entfärbt und anschließend das Ergebnis ausgewertet.

Tabelle 7 Ergebnis der biochemischen Untersuchung der Hüllproteingen-transgenen Pflanzen.

Zahlen in Spalte 2 (Segregationsanalyse): geschätzte Zahl der T-DNA-Kopien anhand des Verhältnisses Kanamycin-resistenter Keimlingen zu nicht-resistenten. +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, n.t.: nicht getestet.

N.b. Konstrukte	Segregations -analyse	npII- PCR	GUS	Southern 19,5k-Sonde	Northern 19,5k-Sonde	Western 19,5k- Antikörper	ELISA CP
CP							
13	1	+	+	+	+	n.t.	n.t.
17	1	+	-	-	+	n.t.	n.t.
19	1	+	+	+	+	+	-
28	1	+	+	+	+	+	-
29	3 und mehr	+	+	+	+	n.t.	n.t.
30	1	+	+	+	+	n.t.	n.t.
31	1	+	+	+	+	+	-
32	1	+	+	+	+	+	-
56	1	+	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
77	1	+	+	+	+	n.t.	n.t.
81	1	+	+	+	+	+	-
84	1	+	-	+	+	+	-
CP-VPg							
60	1	+	+	+	+	-	-
98	2	+	-	+	-	n.t.	n.t.
228	2	+	-	-	-	n.t.	n.t.
238	2	+	-	-	-	n.t.	n.t.
247	2	+	-	-	-	n.t.	n.t.
267	2	+	+	+	+	-	-
268	1	+	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
300	3 und mehr	+	-	-	-	n.t.	n.t.
305	3 und mehr	+	-	-	-	n.t.	n.t.
306	3 und mehr	+	-	-	-	n.t.	n.t.
NLATCP							
78	1	+	+	+	+	-	-
94	1	+	-	+	+	-	-
172	1	+	-	+	-	n.t.	n.t.
175	1	+	-	+	-	n.t.	n.t.
220	1	+	+	-	-	n.t.	n.t.
261	1	+	-	+	-	n.t.	n.t.
269	1	+	-	+	-	n.t.	n.t.
270	1	+	-	+	+	-	-
278	1	+	-	+	n.t.	n.t.	n.t.
286	3 und mehr	+	+	-	-	n.t.	n.t.
302	1	+	-	-	-	n.t.	n.t.
303	1	+	-	+	+	n.t.	n.t.

6.3 19,5k-Gen-Klonierungsstrategie für das pflanzliche Transformationssystem

Das 19,5k-Gen wurde in der PCR mit den Primern 19,5k 5'NcoI und 19,5k 3'XbaI amplifiziert. Als Zielsequenz diente das Plasmid p259 PS 35S CP (Prill et al., 1988). Die Primer erzeugten am 5'-Ende eine NcoI-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine XbaI-Schnittstelle. Die Aminosäuresequenz des P19,5k wurde durch die Einführung der Restriktionsschnittstellen nicht verändert. Das 5'-Ende bzw. das 3'-Ende der 19,5k-Gen-Sequenz sah nach der PCR-Mutagenese wie folgt aus:

5'- **CC⁺¹ ATG GAA GAA GAC GAC CAC GCA GGC AAA** - 3'

Das ATG innerhalb der NcoI-Schnittstelle (fettgedruckt) bildet das Startkodon des 19,5k-Gens.

5'- GCA ATG GTT CTT CAT CGA TAG⁺⁵²⁹ TCG ACT **CTA GAC TAG AGT** - 3'

Das Stopkodon (TAG) liegt vor der XbaI-Schnittstelle (fettgedruckt).

Das 19,5k-Gen-PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 550 bp wurde über die eingeführten Restriktionsschnittstellen NcoI und XbaI in die entsprechenden Schnittstellen des Pflanzenexpressionsvektors pe 35S LAT (Maß, unveröffentlicht) kloniert. Dieser Vektor enthält den expressionsverstärkten 35S Promoter sowie den 35S Terminator, einen Translationsverstärker aus dem Sharka-Virus (plum pox virus; PPV) und das Hüllprotein des PPV. Zur Klonierung des 19,5k-Gens in diesen Vektor mußte das Hüllprotein entfernt werden. Dazu wurde das Plasmid pe 35S LAT mit NcoI und XbaI verdaut und nach Gelelektrophorese ein 3.781 bp Fragment eluiert. In den geöffneten Vektor – nun ohne das Hüllprotein des PPV – wurde das 19,5k-PCR-Genfragment, gerichtet über die NcoI und XbaI-Restriktionsschnittstelle, ligiert.

Der entstandene Vektor pe 35S 19,5k wurde mit HindIII verdaut und die Expressionskassette isoliert. Die Kassette wurde in den ebenfalls mit HindIII verdauten Vektor pLX PAT GUS (un-

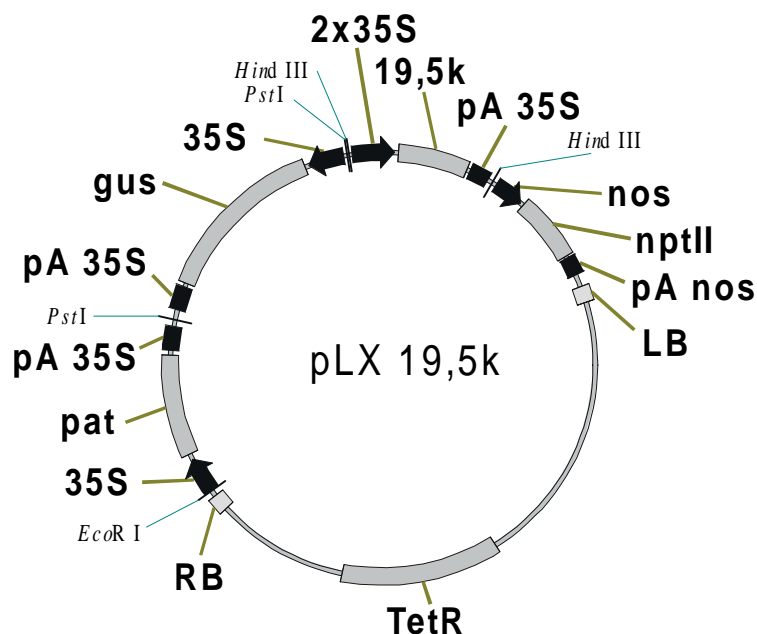


Bild 13 Plasmid pLX 19,5k.

Innerhalb der T-DNA liegen drei Markergene, das nptII-Gen, das pat-Gen und das gus-Gen. In die singuläre HindIII-Restriktionsschnittstelle des Ausgangsvektors wurde das 19,5k-Genkonstrukt kloniert. 35S: Promoter des CaMV 35S-Gens. pA 35S: Transkriptionsterminationssignal des CaMV 35S-Gens. nos: Promoter des nos-Gens. pA nos: Transkriptionsterminationssignal des nos-Gens. LB/RB: linke/rechte Grenze der T-DNA (left and right border). TetR: Tetracyclin-Resistenzgen.

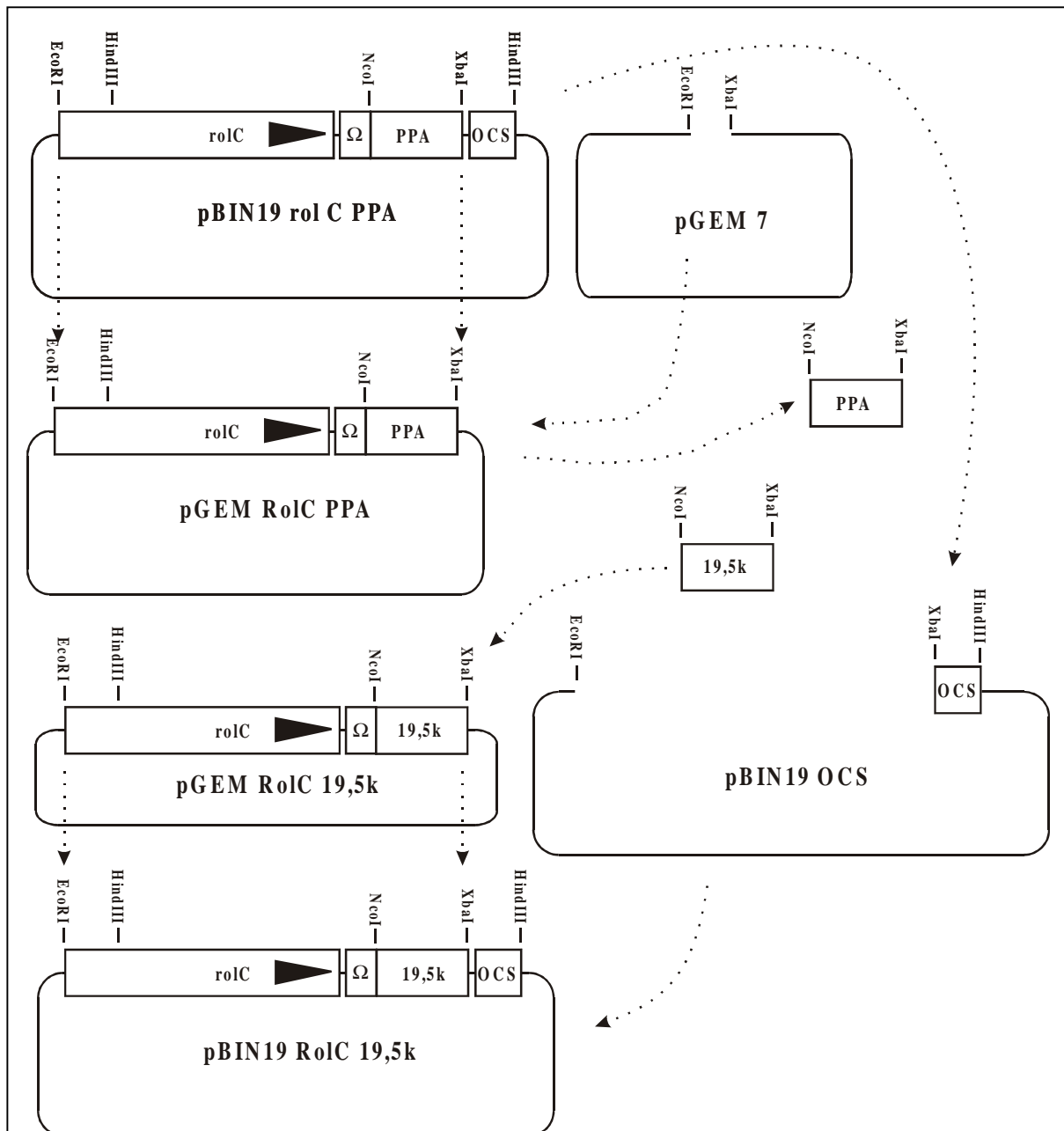


Bild 14 Klonierung des pBIN19 RoIC 19,5k.

Zum Austausch des ppa-Gens im Vektor pBin19 rol C PPA durch das 19,5k-Gen mußte eine Umklonierung vorgenommen werden. Der RoIC-Promoter und das ppa-Gen wurden in ein pGEM7-Plasmid kloniert und anschließend das ppa-Gen durch das 19,5k-Gen ersetzt. Das neue EcoRI/XbaI-Promoter-Fragment wurde zurück in das EcoRI/XbaI-Vektorfragment kloniert. Der Pfeil innerhalb des RoIC-Promoters gibt die Transkriptionsrichtung an. Ω: Ω-Leader des TMV, OCS: Transkriptionsterminationssignal, rolC: Promoter des RoIC-Gens aus *A. rhizogenes*.

veröffentlicht) kloniert. Das rekombinante Plasmid wurde mit pLX 19,5k (Bild 13) bezeichnet. Zur spezifischen Expression des 19,5k-Gens im Phloem wurde der RoIC-Promoter vor das Gen kloniert. Der RoIC-Promoter ist die Regulationssequenz des rolC-Gens aus dem *Agrobacterium rhizogenes*. Ein Plasmid mit dem RoIC-Promoter, pBIN19 rolC-PPA (Lerchl et al., 1995) wurde von J. Lerchl zur Verfügung gestellt. Der Phloem-spezifische Promoter kontrolliert in diesem Plasmid eine bakterielle Pyrophosphatase (PPA). Zum Austausch des ppa-Gens mußte eine Umklonierung erfolgen. Das Plasmid pBIN19 rolC-PPA wurde mit

EcoRI und XbaI verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden zwei Fragmente von ca. 11 kbp (pBIN19 mit OCS-Terminator) bzw. 1.760 bp (RoIC-Promoter mit dem ppa-Gen) isoliert. Das kleinere DNA-Fragment wurde in einen ebenfalls mit EcoRI und XbaI verdauten pGEM 7-Vektor kloniert. In dem erhaltenen Plasmid pGEM RoIC PPA wurde das ppa-Gen durch das 19,5k-Gen über die NcoI und XbaI-Schnittstellen ausgetauscht. Das Ergebnis war das Plasmid pGEM RoIC 19,5k. Aus diesem wurde die Expressionskassette RoIC 19,5k über einen EcoRI/XbaI-Doppelverdau herausgeschnitten und wieder in das pBIN19 OCS EcoRI/XbaI-Fragment eingesetzt. Das Bild 14 beschreibt diese Klonierung. Das Plasmid erhielt den Namen pBIN19 RoIC 19,5k.

Die beiden binären Plasmide pLX 19,5k und pBIN19 RoIC 19,5k wurden durch Elektroporation in *A. tumefaciens* EHA 101 (Hood et al., 1986) eingeführt. Die Integrität der Plasmide wurde durch DNA-Minipräparationen überprüft. Die rekombinanten Agrobakterien wurden zur Transformation von *N. benthamiana* verwendet.

6.4 Nachweis der Expression der 19,5k-Genkonstrukte

In den transgenen Pflanzenlinien sollte der Nachweis der Integration und Expression der Fremdgene geführt werden.

Die transgenen Pflanzen wurden nach der Regeneration auf einem kanamycinhaltigen Selektionsmedium in Erde gepflanzt. Es sollten sich nur Pflanzen entwickeln, welche das Kanamycin-Resistenzgen exprimierten. Obwohl sich die 19,5k-Genkonstrukte und das nptII-Gen auf einer T-DNA befanden und somit gemeinsam in das Pflanzengenom integriert worden sein sollten, wurde dies für die 19,5k-Genkonstrukte explizit überprüft. Ebenso wurde die Expression des 19,5k-Gens, also die Bildung einer mRNA und deren Translation, überprüft.

Für das 35S 19,5k-Genkonstrukt wurden die Linien mit der Nummer 80, 103, 131, 133, 266, 279 und 311 untersucht.

Für das RolC 19,5k-Genkonstrukt wurden die Linien mit der Nummer 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158 und 160 untersucht.

Für die Untersuchung wurde aus mehreren Blättern von 3 - 5 auf kanamycinhaltigem Selektionsmedium (Linien mit dem 35S-Promoter) bzw. auf Erde (ohne Selektion; Linien mit dem RolC-Promoter) angezogenen Nachkommen der verschiedenen Linien die genomische DNA, die RNA sowie die Proteine isoliert.

Der Nachweis der Integration des nptII-Gens in den 35S 19,5k transgenen Linien wurde mit der PCR geführt (Bild 15). Der Nachweis erfolgte wie für die Hüllprotein-Genkonstrukte. Die Größen der DNA-Banden der Linien 80, 103, 131, 133, 279 und 311 entsprachen der errechneten Größe von ca. 500 bp. Die Linie 266 wurde nicht in der PCR getestet.

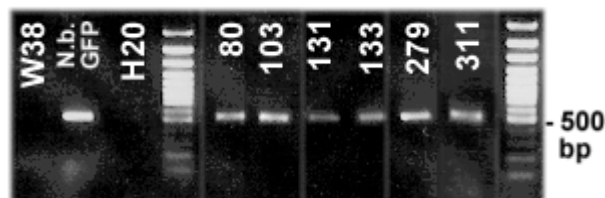
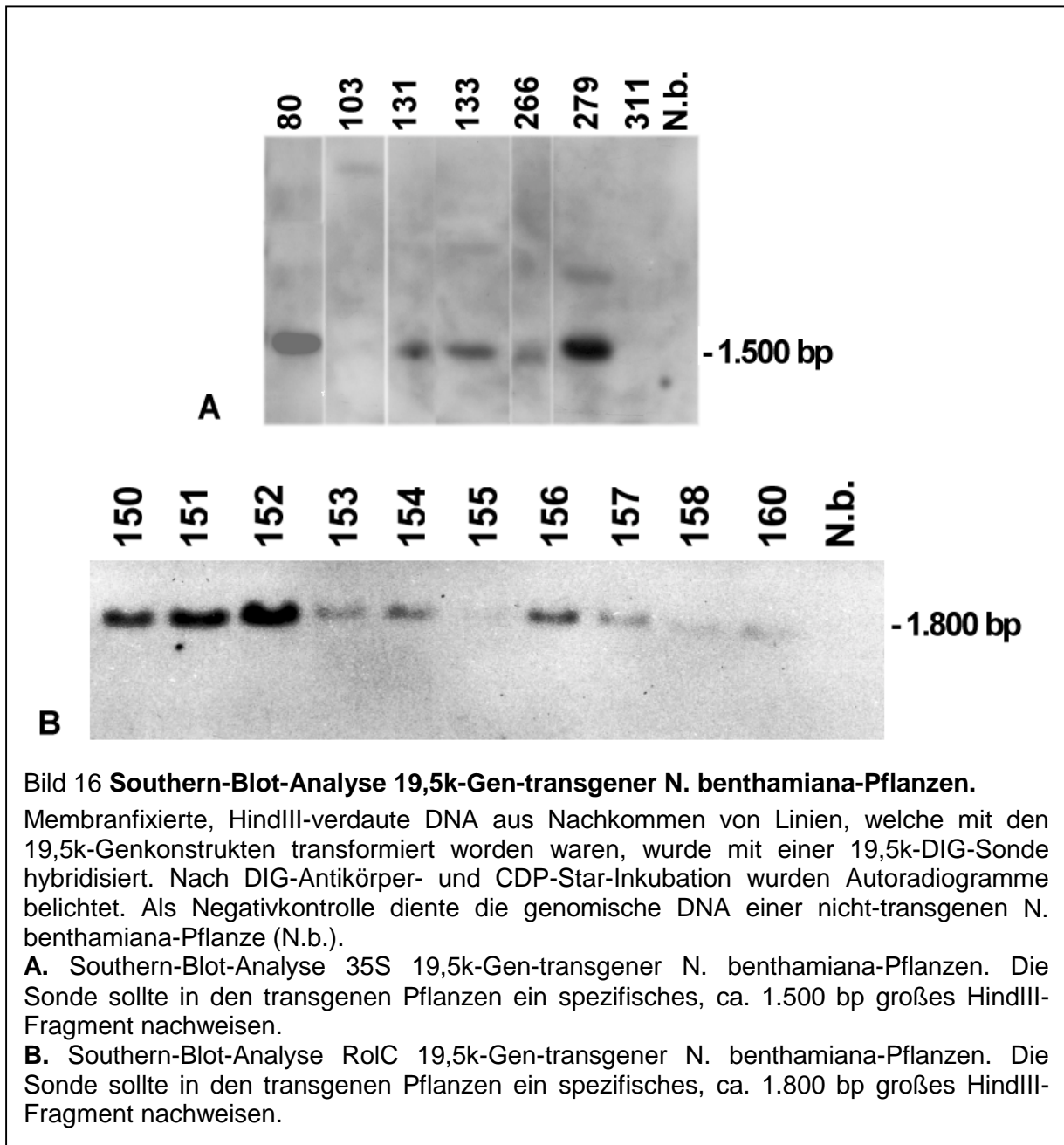


Bild 15 PCR mit nptII-spezifischen Primern zum Nachweis des nptII-Gens in 35S 19,5k-Gen-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen.

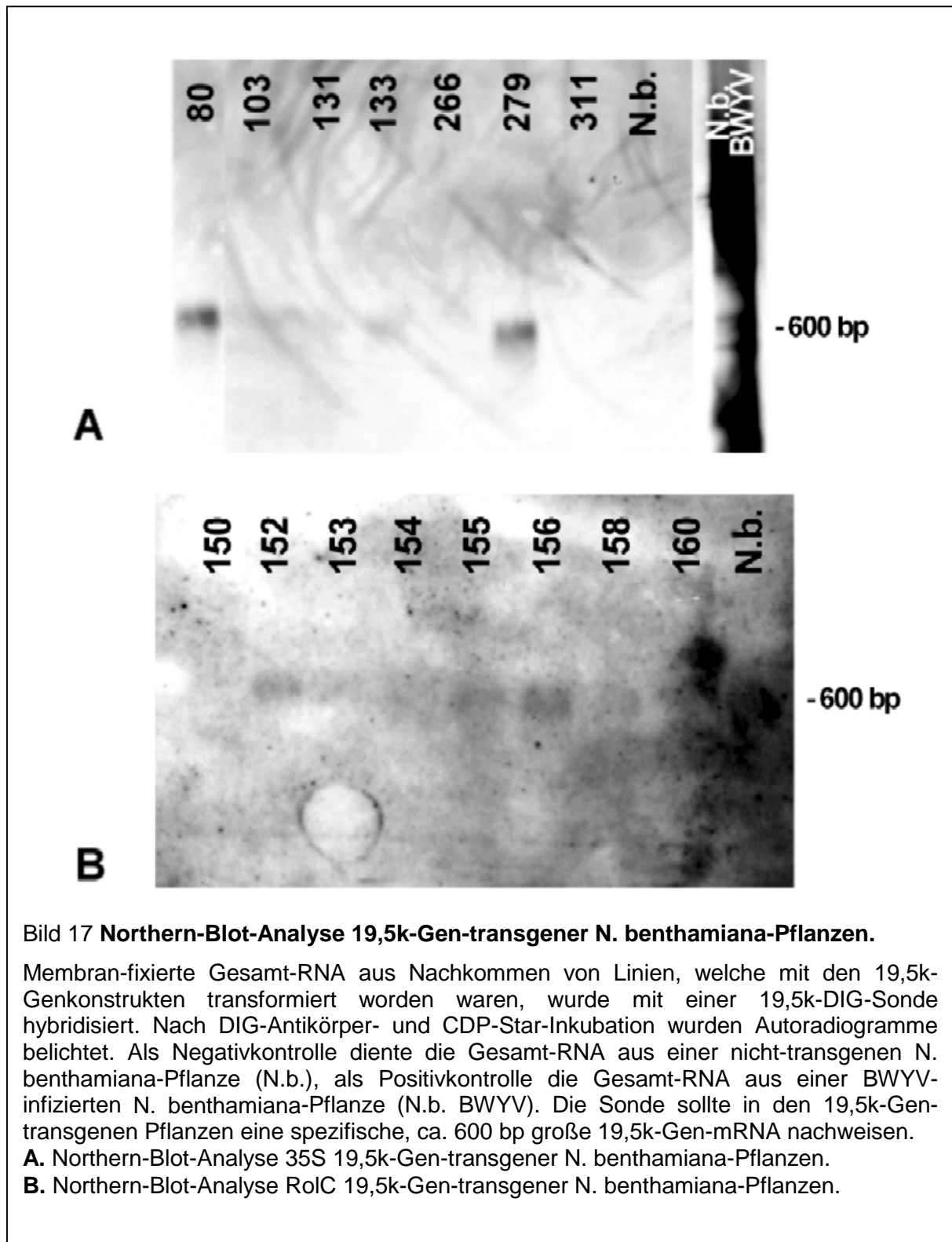
Jeweils 10 µl eines PCR-Ansatzes wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr angefärbt. Als Größenstandard diente die 100 bp-Leiter der Firma MBI. Die Banden liegen bei ca. 500 bp. Als Positivkontrolle diente DNA einer gfp-Gen-transgenen Pflanze, als Negativkontrolle Wasser und DNA einer *N. tabacum*-Pflanze (W38).

Zum Nachweis der Integration der 19,5k-Gene wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt (Bild 16). Dazu wurde die genomische DNA aus ca. 100 mg Blattmaterial mit HindIII verdaut und anschließend in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran wurde der Nachweis mit einer 19,5k-DIG-markierten Sonde geführt. Als Negativkontrolle diente die DNA aus einer nicht-transgenen *N. benthamiana*-Pflanze. In den Linien mit dem 35S-Promoter ließ sich in den Linien 80, 131, 133, 266 und 279 eine Bande in der zu erwartenden Größe von ca. 1.500 bp detektieren. In allen getesteten Nachkommen der geselbsteten RolC 19,5k-Pflanzen konnte das 19,5k-Gen nachgewiesen werden. Die Größe der detektierten Banden entsprach der erwarteten Größe von etwa 1.800 bp. In den Negativkontrollen ließen sich keine Banden nachweisen.

Der Nachweis der Synthese der 19,5k-Gen-mRNA wurde mit der Northern-Blot-Analyse geführt. Die isolierte RNA aus den entsprechenden Nachkommen der zu testenden Linien wurde in einem denaturierenden Agarosegel getrennt und anschließend durch Kapillarkräfte



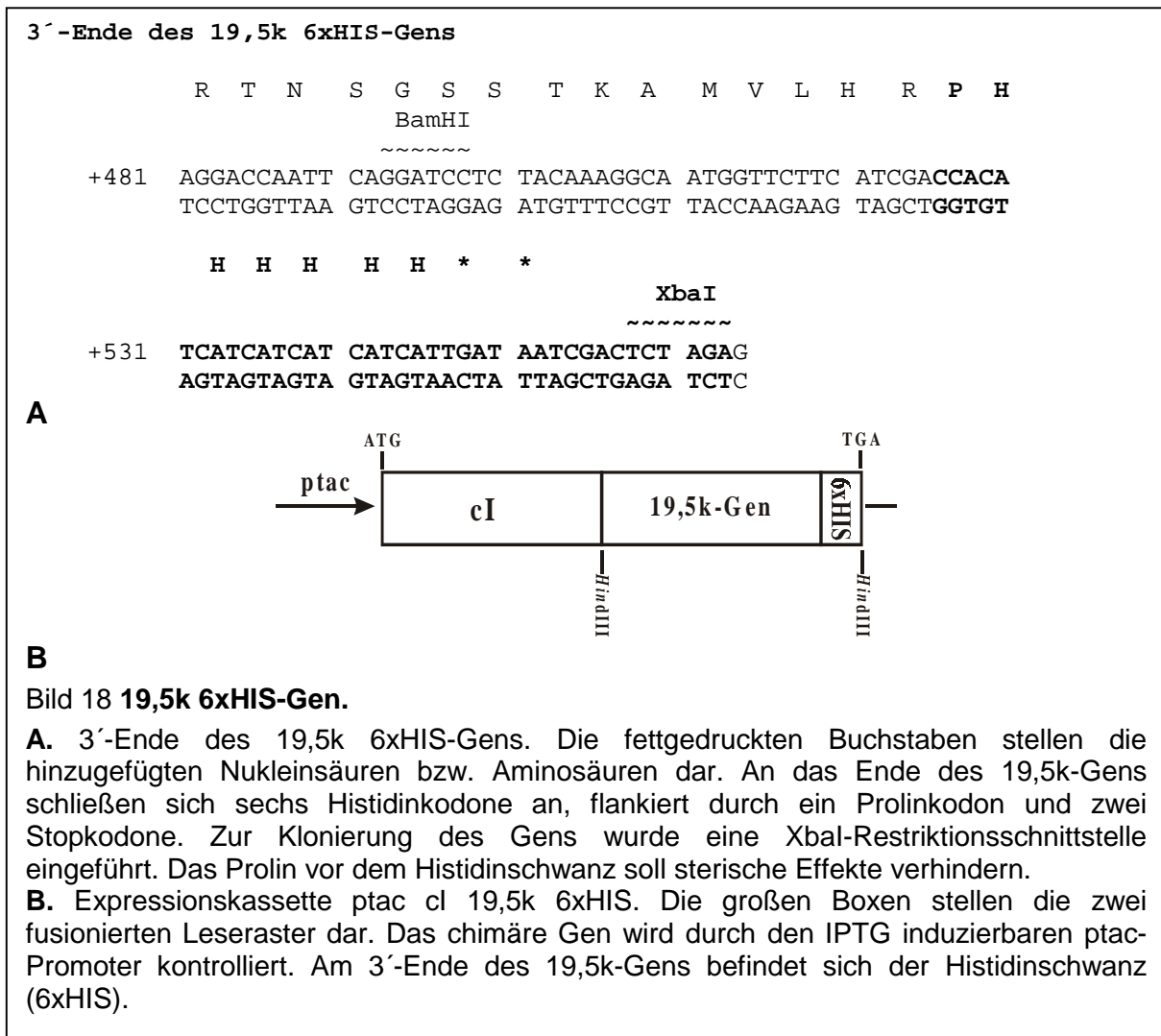
auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Zum Hybridisieren mit der spezifischen 19,5k-Gen-mRNA wurde eine 19,5k-DIG-markierte Sonde verwendet. Als Negativkontrolle diente die RNA aus einer nicht-transgenen N. benthamiana-Pflanze. Das Bild 17 zeigt das Ergebnis der Northern-Blot-Analyse. In der Negativkontrolle ließ sich keine Bande erkennen. In den 35S-Promoter Pflanzenlinien 80, 103, 131, 133 und 279 ließen sich Banden detektieren. In den RolC-Promoter Pflanzen zeigten die Linien 152, 153, 154, 155, 156, 158 und 160 Banden auf einer Höhe von ca. 600 bp. Die Linien 151 und 157 wurden nicht untersucht. Die Größe der nachgewiesenen mRNA-Moleküle entspricht damit den Erwartungen. Zum Nachweis der Expression des P19,5k in den transgenen Pflanzen wurde ein P19,5k-spezifischer Kaninchen-Antikörper hergestellt. Zur Isolierung des P19,5k-Antigens sollte am N-Terminus des Proteins ein Histidin-tag angehängt werden; dazu wurden über eine mutagenisierende PCR sechs Histidinkodone am 3'-Ende des 19,5k-Gens angefügt. Diese Histidine ermöglichten im nachfolgenden eine Isolierung und Reinigung des Proteins nach Überexpression in E. coli über eine Nickel-NTA-Säule.



Die Sequenz des benötigten 3'-Primers, 19,5k 6xHIS XbaI, sah wie folgt aus:

5' - GGT **TCT AGA** TTA TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TGG TCG ATG AAG
AAC CAT TGC CTT TGT AGA GGA TCC - 3'

Die XbaI-Schnittstelle ist fettgedruckt. Es folgen zwei Stopkodone (unterstrichen) und sechs Histidinkodone. Das Stopkodon ist durch TGG (kursiv) ersetzt worden.

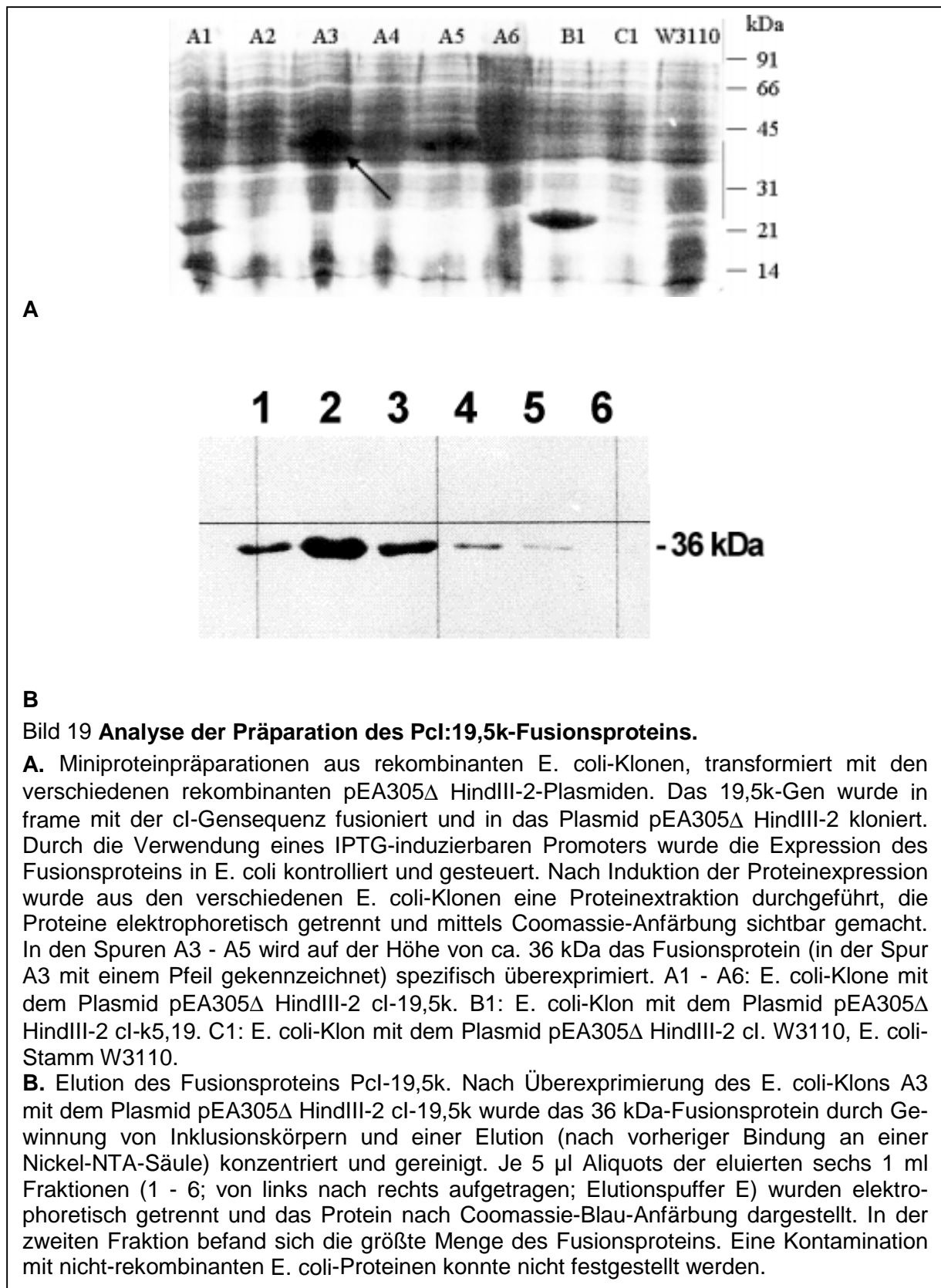


Als 5'-Primer konnte der 19,5k 5'NcoI Primer verwendet werden. Das 19,5k-Gen besaß nach der PCR-Amplifizierung am 5'-Ende eine NcoI-, am 3'-Ende eine XbaI-Schnittstelle sowie sieben zusätzliche Kodone. Nach NcoI/XbaI-Verdau wurde das Fragment in einen pflanzlichen Expressionsvektor, pRT 103, ebenfalls NcoI/XbaI verdaut, kloniert. Das Ergebnis war das Plasmid pRT 19,5k 6xHis. Die Veränderung der Proteinsequenz am C-Terminus sah wie im Bild 18 beschrieben aus.

In einem E. coli-Expressionsvektor wurde die Gensequenz des Antigens (P19,5k 6xHis) mit einem Teil des ORF des cl-Proteins aus dem Bakteriophagen λ in frame hinter einem induzierbaren Promoter kloniert. Nach Transformation von E. coli mit diesem rekombinanten Vektor wurde in einem bestimmten Vermehrungsstadium die Expression angeschaltet. Das rekombinante Protein wurde gereinigt und konnte zur Immunisierung von Kaninchen verwendet werden.

Im Detail wurde dazu die 574 bp große 19,5k-Gensequenz in einer PCR mit spezifischen 5' und 3'-HindIII-Primern (5.1.3) amplifiziert. Als Zielsequenz diente das Plasmid pRT 19,5k 6xHis. Das Fragment wurde über die HindIII-Schnittstellen in frame zu dem cl-ORF in den Expressionsvektor pEA305 Δ HindIII-2 kloniert.

Die rekombinanten Plasmide wurden in den E. coli-Stamm W3110 lacI^QL8 transformiert. Die Orientierung der 19,5k-Gensequenz wurde nach Plasmidisolierung aus Amp^R-Kolonien über Restriktionsverdau mit EcoRI und BamHI bestimmt. Die verschiedenen Plasmide mit dem 19,5k-Gen in richtiger Orientierung zum Promoter (pEA305 Δ HindIII-2 cl-19,5k), in umgekehrter Orientierung zum Promoter (pEA305 Δ HindIII-2 cl-k5,19) und der Ausgangsvektor wurden in dem E. coli-Stamm W3110 angezogen und nach IPTG-Induktion Proteinminipräparationen gewonnen.



In einigen Proteinpräparationen von Klonen mit dem Plasmid pEA305Δ HindIII-2 cl-19,5k konnte nach PAA-Gelelektrophorese und Coomassie-Anfärbung das erwartete Fusionsprotein von ca. 36 kDa detektiert werden (Bild 19 A; Klon A3, A4 und A5). In der Präparation aus dem Klon mit dem Plasmid pEA305Δ HindIII-2 cl-k5,19 ließ sich eine wesentlich kleinere Bande bei ca. 22 kDa nachweisen (Bild 19 A, Klon B1). Vermutlich wurde die Translation des Fusionsproteins durch ein Stopkodon in der Antisense-Sequenz beendet. In der Präparation

aus einem Klon mit dem Ausgangsvektor konnte keine zusätzliche Bande im Vergleich mit der Präparation aus einem Klon des nicht-transformierten *E. coli*-Stammes festgestellt werden.

Von zwei Klonen (Bild 19 A, Klon A3 und A4) mit dem Plasmid pEA305Δ HindIII-2 cl-19,5k wurden im ersten Schritt Inklusionskörper isoliert. Das so vorgereinigte Protein wurde anschließend über eine Nickel-NTA-Säule weiter konzentriert und gereinigt. Die einzelnen Fraktionen der Elution wurden in einer PAA-Gelelektrophorese analysiert (Bild 19 B).

Durch die Überexprimierung konnte pro Ansatz über 1 mg hochaufgereinigtes Fusionsprotein Pcl-19,5k, bestimmt durch einen dot blot-Test (Daten werden nicht gezeigt), gewonnen werden. Das isolierte Protein wurde zur Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Anschließend wurde den Kaninchen zu verschiedenen Zeiten Blut entnommen und das Serum aus dem Blut gewonnen.

Die Seren der beiden Kaninchen wurden auf ihre Wirksamkeit zum Nachweis des Antigens hin untersucht. Auf Nitrocellulosestreifen wurden verschiedene Verdünnungen (8 pg – 2 ng) des Antigens (Pcl-19,5k) aufgetropft. Diese Streifen wurden mit einer 1 : 50, 1 : 200 und einer 1 : 500 Verdünnung der Seren der verschiedenen Blutentnahmen inkubiert. Zudem wurden die Seren der zwei immunisierten Kaninchen verglichen. Die Streifen wurden nach Inkubation mit den Kaninchen-Antikörpern mit einem AP-konjugierten Anti-Kaninchen Maus-Antikörper inkubiert, und anschließend erfolgte über eine Farbreaktion der Nachweis der Bindung der Kaninchen-Antikörper mit dem Antigen. (Die Daten werden nicht gezeigt.)

Eine 1 : 500-Verdünnung des Serums der dritten Blutabnahme war ausreichend, um auf den Teststreifen eine Farbreaktion an der Auftragsstelle des Antigens noch bis zu einer Konzentration bis 8 pg zu bewirken (Bild 20). Dabei war das Serum des Kaninchens mit der Nummer 770 etwas sensibler. Dieses Serum wurde von der DSMZ zur Gewinnung der IgGs gereinigt und in einer Konzentration von 1 mg IgG/ml abgefüllt.

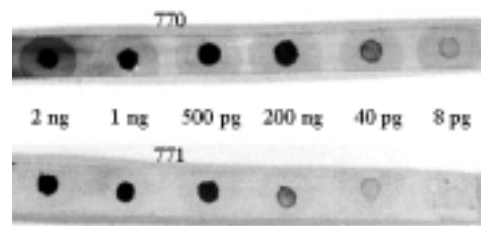


Bild 20 Vergleich der Nachweisgrenze der Seren zweier mit dem P19,5k-Antigen immunisierter Kaninchen (770 und 771).

Auf Nitrocellulosestreifen wurden verschiedene Mengen P19,5k-Antigen aufgetropft (von 2 ng bis 8 pg) und jeweils mit den Seren in einer 1 : 500 Verdünnung inkubiert. Der Bindungsnachweis des Kaninchen-Antikörpers an das Antigen erfolgte über die Inkubation mit einem AP-konjugierten-Anti-Kaninchen-Maus-Antikörper und der Umsetzung eines Farbsubstrats (NBT und BCIP). Das Serum des Kaninchens mit der Nummer 770 (oberer Streifen) reagierte besser mit dem Antigen.

In der Western-Blot-Analyse mit verschiedenen Konzentrationen des Antigens konnte bei der Verwendung der Chemilumineszenzreaktion eine Nachweisgrenze von ca. 10 ng erreicht werden (Daten werden nicht gezeigt). Zur Überprüfung, ob dieser polyklonale Antikörper auch das virale P19,5k erkennt, wurden Proteinpräparationen aus einer BWYV-infizierten Raps-Pflanze und *N. benthamiana*-Pflanze sowie einer nicht-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze gewonnen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese Membran wurde mit einer 1 : 500 Verdünnung des aufgereinigten Serums inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Inkubation mit einem zweiten AP-konjugierten Anti-Kaninchen Maus-Antikörper und der anschließenden Farbreaktion mit dem Substrat (Bild 21). Der polyklonale Antikörper weist in der Western-Blot-Analyse eine spezifische, ca. 22 kDa große Bande in den infizierten Pflanzen (*N. benthamiana* und *B. napus*, Bild 21 erste und zweite Spur) nach, zusätzlich wurde eine vermutlich unspezifische Bande bei ca. 36 kDa detektiert.

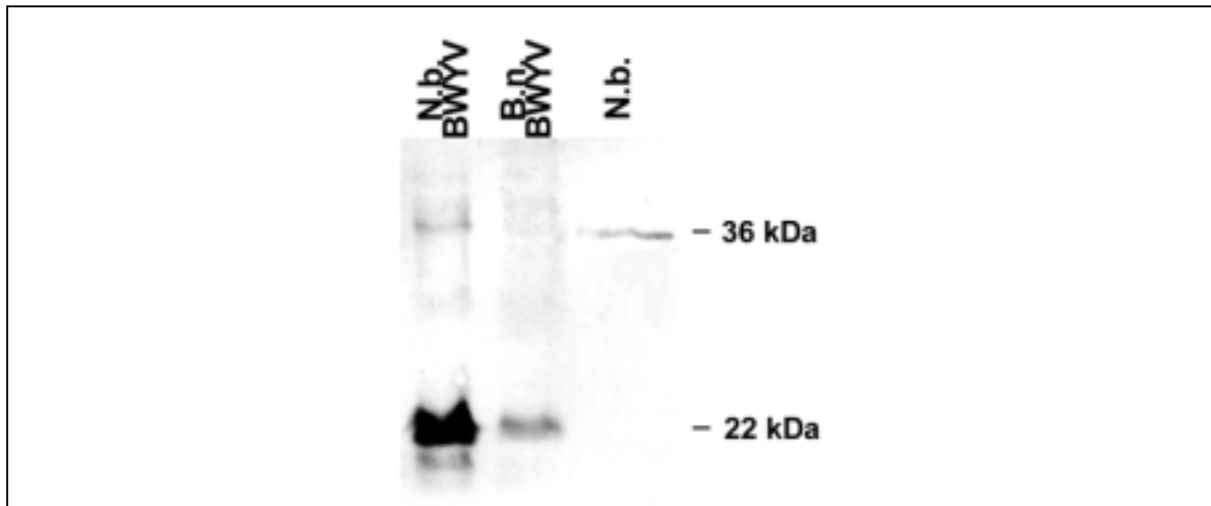


Bild 21 Western-Blot-Analyse infizierter Wirtspflanzen.

Membran-fixiertes Gesamtprotein aus *N. benthamiana* und *B. napus*, welche mit BWYV infiziert worden waren, wurden mit P19,5k-spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antikörpern inkubiert. Nach AP-konjugierter Anti-Kaninchen-Maus-Antikörper-Inkubation wurde der Blot mit NBT und BCIP behandelt. Der P19,5k-Antikörper sollte in den infizierten Pflanzen ein spezifisches, ca. 22 kDa großes Protein nachweisen. Als Negativkontrolle diente Gesamtprotein aus einer nicht-transgenen Pflanze (N.b.).

Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse der transgenen Pflanzen stellt das Bild 22 dar. Es ließ sich eine spezifische, ca. 22 kDa große Bande in der Spur mit der Proteinpräparation aus der BWYV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze nachweisen (Bild 22 A und B). In allen Proben wies das Serum eine Bande von ca. 36 kDa nach. Das P19,5k erscheint durch posttranslationale Modifikation, wahrscheinlich Phosphorylierung (Tacke et al., 1993), größer als rechnerisch erwartet. Für die untersuchten 35S 19,5k-Gen-transgenen Pflanzen ließen sich in den Linien 80, 131 und 133 eine P19,5k-spezifische Bande von ca. 22 kDa nachweisen. Die Negativkontrolle zeigte keine Bande in dieser Proteingröße. In den untersuchten RoIC 19,5-Gen-transgenen Linien 150, 155, 158 und 163 (Bild 22 B) konnte die Expression des P19,5k festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Nachweisversuche der 19,5k-Gen-transgenen Pflanzen mit verschiedenen molekularen Methoden sind in der Tabelle 8 zusammengefaßt.

Die Linien 80, 103, 131 und 133 wurden in einem TAS-ELISA auf Expression eines Hüllproteinfragmentes, wie unter 6.2 beschrieben, getestet, um auszuschließen, daß zusätzlich das Leseraster des Hüllproteingens translatiert wird.

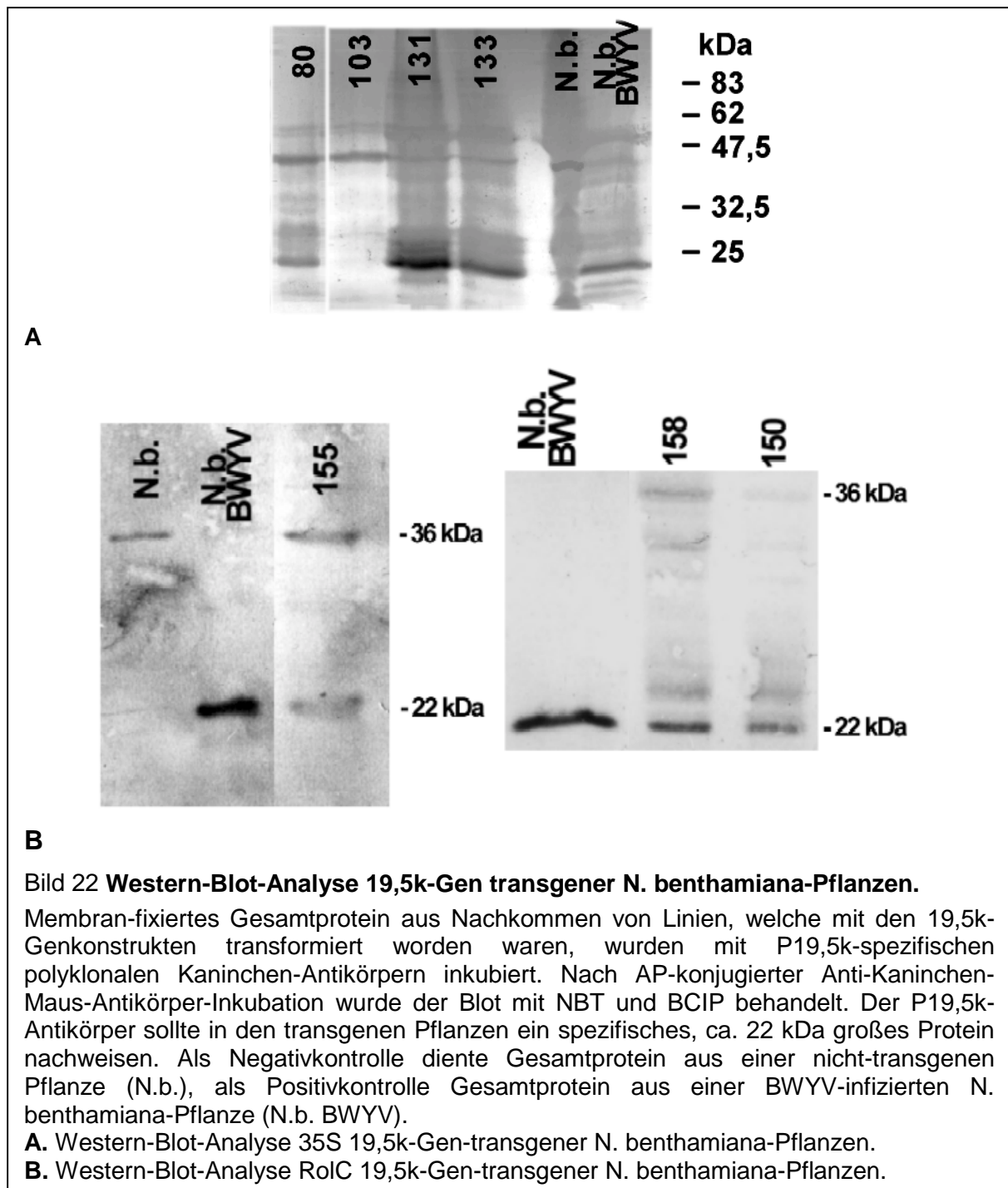


Tabelle 8 Ergebnis der biochemischen Untersuchung der 19,5k-Gen-transgenen Pflanzen.

Zahlen in Spalte 2 (Segregationsanalyse): geschätzte Zahl der T-DNA-Kopien anhand des Verhältnisses Kanamycin-resistenter Keimlingen zu nicht-resistenten. +: positives Ergebnis, -: negatives Ergebnis, n.t.: nicht getestet. Die Linien 80, 103, 131 und 133 wurden im TAS-ELISA auf die Expression eines Hüllproteinfragmentes, wie unter 6.2 beschrieben, getestet.

N.b. Konstrukte	Segregations-analyse	nptII-PCR	GUS	Southern 19,5k-Sonde	Northern 19,5k-Sonde	Western 19,5k-Antikörper	ELISA CP
19,5k							
80	1	+	n.t.	+	+	+	-
103	-	+	-	-	+	-	-
131	1	+	+	+	+	+	-
133	3 und mehr	+	-	+	+	+	-
266	n.t.	n.t.	n.t.	+	-	n.t.	n.t.
279	2	+	+	+	+	n.t.	n.t.
311	3 und mehr	+	-	-	-	n.t.	n.t.
RoIC 19,5k							
150	n.t.	n.t.	n.t.	+	-	+	n.t.
151	n.t.	n.t.	n.t.	+	n.t.	n.t.	n.t.
152	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	n.t.	n.t.
153	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	n.t.	n.t.
154	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	n.t.	n.t.
155	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	n.t.
156	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	n.t.	n.t.
157	n.t.	n.t.	n.t.	+	n.t.	n.t.	n.t.
158	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	n.t.
160	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	n.t.	n.t.

6.5 Versuche zur Virusgen-vermittelten Virus-Resistenz

Die Virusgen-exprimierenden Pflanzen wurden hergestellt, um eine BWYV-Resistenz zu erzeugen. Um die Wirksamkeit dieser Resistenz überprüfen zu können, war es notwendig, Standard-Infektionsbedingungen zu entwickeln. Wie bei anderen Viren - z. B. TMV - möglich, läßt sich BWYV nicht durch eine mechanische Inokulation übertragen. Die Pflanzen mußten durch Virus-tragende Blattläuse infiziert werden. Die Blattläuse wurden auf mit dem Ascherslebener BWYV-Isolat ASL5 (von K. Graichen, BAZ Aschersleben) infizierten Rapspflanzen gehalten. Für die Resistenztests sollte eine Blattlausanzahl gewählt werden, die bei nicht-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen gerade eine 100%ige Infektionsrate gewährleistet, jedoch nicht durch eine eventuell zu massive Inokulation eine potentielle Resistenz in den transgenen Pflanzen durchbricht. In zwei Versuchsansätzen - A und B - sollte diese Blattlausanzahl ermittelt werden.

Für den Ansatz A wurden je drei BWYV-tragende Läuse auf neun nicht-transgene *N. benthamiana*-Pflanzen gesetzt; für Ansatz B je zehn Läuse auf sieben Pflanzen. Die Pflanzen besaßen zu diesem Zeitpunkt zwei bis drei Laubblätter. Die Blattläuse wurden nach drei Tagen Saugzeit auf diesen Pflanzen mit einem Insektizid getötet. Vier weitere Pflanzen wurden nicht-infiziert. Nach drei und nach sechs Wochen wurden die Pflanzen im ELISA untersucht.

100 mg der Blätter wurden gemörsert und 1 : 30 mit ELISA-Probenpuffer verdünnt und der Extrakt im TAS-ELISA verwendet. Der ELISA wurde mit Hüllprotein-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die ELISA-Mittelwerte des Ansatzes A (drei Blattläuse) lagen bei 1,109 E_{405} nach drei Wochen bzw. 0,825 E_{405} nach sechs Wochen; die Mittelwerte von B (zehn Läuse) bei 1,269 E_{405} bzw. bei 1,331 E_{405} (Tabelle 9, Versuch 1 untere Zeilen). Die E_{405} -Werte der -infizierten Pflanzen lagen bei ca. 0,000. Bei der Verwendung von zehn Blattläusen waren alle infizierten Pflanzen deutlich im Wachstum deprimiert und in allen Pflanzen konnte durch ELISA das BWYV-Hüllprotein nachgewiesen werden. Die Depression konnte nach ca. zwei Wochen p.i. beobachtet werden. Bei Infektion mit drei Blattläusen liessen sich zwei Pflanzen mit ELISA-Werte E_{405} unter dem Schwellenwert 0,100 ermitteln und sie zeigten auch optisch keine Wachstumsdepression im Vergleich mit den nicht-infizierten Kontrollpflanzen.

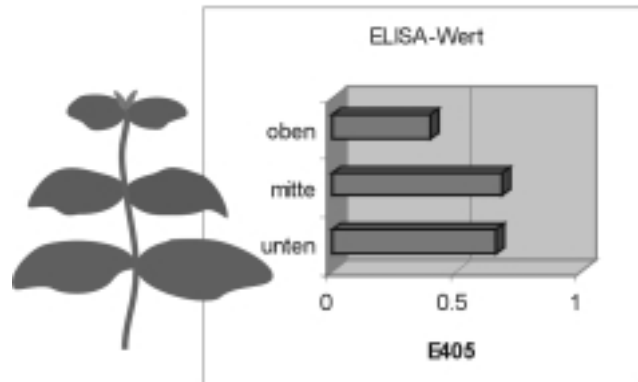


Bild 23 Vergleich BWYV-infizierter und nicht-infizierter *N. benthamiana*-Pflanzen.

Die Pflanzen links (1. und 2. Reihe) wurden nicht infiziert, rechts (3. und 4. Reihe) mit fünf bis sechs BWYV-tragenden Läusen im Gewächshaus infiziert. Die Pflanzen sind ca. sechs Wochen alt. Die virusinfizierten Pflanzen zeigten deutliche Wachstumsdepressionen.

Diagramm 1 ELISA-Werte von Blattextrakten BWYV-infizierter *N. benthamiana*-Pflanzen

Von sechs BWYV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen wurde aus Blättern der oberen, der mittleren sowie unteren Blattetage jeweils ein Extrakt gewonnen, und im TAS-ELISA (Mittelwerte werden gezeigt) wurde der Virushüllproteingehalt bestimmt.



Die Infektion mit zehn BWYV-tragenden Aphiden äußerte sich also in einem höheren ELISA-Mittelwert über alle Pflanzen sowie in einem 100%igen Infektionserfolg. In späteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Verwendung von fünf bis sechs Virus-tragenden Blattläusen ausreichend war, um in *N. benthamiana* eine 100%ige Infektion zu erreichen (Daten werden nicht gezeigt).

Die durchgeführten Resistenztests mit transgenen Pflanzen im Gewächshaus bestätigten die Erfahrungen von K. Graichen, daß die ELISA-Werte zwischen den infizierten Pflanzen stark schwankten. Die Versuche wurden mit einem zu kleinen Stichprobenumfang durchgeführt und konnten deshalb nicht sinnvoll ausgewertet werden. Die Erfahrungen dieser Tests können wie folgt zusammengefaßt werden.

Die Virusverteilung in einer BWYV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze nimmt von unten nach oben hin ab (Diagramm 1). Sie kann im Extremfall in den obersten Blättern den Wert E_{405} von 0 annehmen. Blattextrakte aus der mittleren Ebene schwankten in ihren ELISA-Werten von 0 bis $2 E_{405}$. Durch die Ernte mehrerer Blätter aus möglichst einer Blattebene konnte die Varianz der ELISA-Werte innerhalb einer Pflanze und zwischen den infizierten Pflanzen verringert werden. Die Blattmasse infizierter *N. benthamiana*-Pflanzen war wesentlich geringer als bei nicht-infizierten Pflanzen (Bild 23). Eine wöchentliche Probenahme war deshalb nicht möglich. Die Virusvermehrung, bestimmt durch ELISA, war von Pflanze zu Pflanze stark unterschiedlich. Sie schwankte zum Teil von 0,1 bis $2 E_{405}$ im ELISA und stand häufig auch nicht in Korrelation mit den Virussymptomen, wie z. B. der Wachstumsdepression. Wegen der starken Schwankungen der ELISA-Werte zwischen den einzelnen Pflanzen aber auch innerhalb der Pflanze selbst, konnten die Daten der durchgeführten Resistenztests nicht verwendet werden. Der Stichprobenumfang hätte stark vergrößert werden müssen, um signifikante Werte zu erhalten.

Dennoch werden im nachfolgenden die Ergebnisse der Resistenztests mit RolC 19,5k-Gen-transgenen Pflanzenlinien dargestellt. Wegen der geringen Stichprobenumfänge - besonders der infizierten, nicht-transgenen Kontrollen - können die Ergebnisse zur Virusresistenz als nicht signifikant angesehen werden, sondern als Trend.

In zwei transgenen Linien, 150 und 158, wurde überprüft, ob sich auch hier die Anzahl der eingesetzten, Virus-tragenden Blattläuse zur Infektion in der Virusvermehrung widerspiegelt. Die ELISA-Werte der Pflanzen, die mit drei Blattläusen infiziert worden waren, waren niedriger, als jene, welche mit zehn Blattläusen infiziert worden waren. Während die ELISA-Werte der Nachkommen der transgenen Linien, welche mit zehn Blattläusen infiziert waren, nach drei Wochen p.i. höher waren, als die der infizierten, nicht-transgenen Kontrolle, kehrte sich dieses nach weiteren drei Wochen um (Tabelle 9, Versuch 1). Die Linien, welche mit drei Läusen besiedelt worden waren, zeigten zu beiden Probenahmezeiten niedrigere ELISA-Werte als die infizierten Kontrollen.

**Tabelle 9 Resistenztest mit Nachkommen RoIC 19,5k-Gen-transgener
N. benthamiana-Linien**

Die Samen der F1 wurden im Gewächshaus ausgesät. Die Keimlinge wurden nach Bildung von zwei bis drei Laubblättern mit fünf bis sechs Virus-tragenden Blattläusen für zwei bzw. drei Tage besiedelt. Anschließend wurden die Blattläuse mit einem Insektizid getötet. Drei und sechs Wochen nach Infektion wurden mehrere Blattstücke aus der mittleren Pflanzenhöhe entnommen und durch Mörsern ein Extrakt gewonnen. Die Blattextrakte wurden 1 : 30 in ELISA-Probenpuffer verdünnt und der Virusgehalt im TAS-ELISA mit Hüllprotein-spezifischen Antikörpern bestimmt. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchen gewonnen. Es werden die ELISA-Mittelwerte der Nachkommen einzelner Linien angegeben.

Versuch 1

Linie und Anzahl der Blattläuse	Anzahl der getesteten Nachkommen		ELISA-Wert E ₄₀₅	
	(drei	sechs Wochen p.i.)	(drei	sechs Wochen p.i.)
150 - 10 Blattläuse	15	12	1,411	0,573
150 - 3 Blattläuse	19	17	0,824	0,315
158 - 10 Blattläuse	13	11	1,402	0,740
158 - 3 Blattläuse	18	17	0,774	0,375
Kontrolle - 10 Blattläuse	7	7	1,269	1,331
Kontrolle - 3 Blattläuse	9	9	1,109	0,825

Versuch 2

Linie	Anzahl der getesteten Nachkommen		ELISA-Wert E ₄₀₅	
	(drei	sechs Wochen p.i.)	(drei	sechs Wochen p.i.)
150	11	11	1,491	0,563
151	5	5	0,002	1,320
152	9	9	0,830	1,209
153	12	-	2,300	-----
154	12	-	1,540	-----
155	12	12	0,965	0,749
Kontrolle	6	6	1,027	1,000

Versuch 3

Linie	Anzahl der getesteten Nachkommen		ELISA-Wert E ₄₀₅	
	(drei Wochen p.i.)		(drei Wochen p.i.)	
150	12		0,563	
151	18		1,320	
152	17		1,209	
155	15		0,749	
160	16		0,812	
Kontrolle	5		1,194	

In einem Versuch 2 wurden aufspaltende Nachkommen der Linien 150, 151, 152, 153, 154 und 155 getestet, in einem Versuch 3 die Linien 150, 151, 152, 155, 160 (Tabelle 9). Einige Linien, z. B. die Linie 153, zeigten schon nach drei Wochen p.i. sehr hohe ELISA-Werte im Vergleich zu den Kontrollen. Der ELISA-Mittelwert der Linie 151 war zu Beginn sehr niedrig, um dann zum zweiten Probenahmezeitpunkt über den Wert der Kontrolle anzusteigen. Die ELISA-Untersuchung der Linie 150 ergab zu Anfang höhere Werte, später deutlich niedrigere.

Nur die Linie 155 zeigte zu beiden Zeitpunkten etwas niedrigere Werte als die Kontrollen. Im Versuch 3 (Tabelle 9) wurde nur zu einem Zeitpunkt gemessen. Die Linien 150, 155 und 160 hatten niedrigere Werte als die Kontrollen, die Linien 151, 152 höhere.

Um homozygotes Material testen zu können, wurden von den Linien 150, 152 und 155 durch Selbstung der F1 jeweils zehn F2-Pflanzen angezogen, welche wiederum geselbstet wurden. Die Samen jeder dieser Pflanzen wurden einem Segregationstest auf Kanamycin-Resistenz unterzogen. Für den Resistenztest (Tabelle 10) wurden die Samen von F2-Pflanzen verwendet, welche im Segregationstest bei ca. 50 ausgelegten Samen bezüglich der

Kanamycin-Resistenz keine Aufspaltung zeigten, also vermutlich von homozygoten F₂-Pflanzen abstammten.

Folgende homozygote Linien wurden für den Resistenztests der Tabelle 10 verwendet: von der Linie 150 die F₂ 150-3 und -4, von der Linie 152 die F₂ 152-1 und von der Linie 155 die F₂ 155-1. Die untersuchten Linien zeigten nach drei Wochen niedrigere ELISA-Werte als die Kontrollpflanzen. Nach weiteren sechs Wochen lagen aber bei den Linien 152-5 und 155-1 die Werte deutlich über denen der Kontrollen. Nur bei den Linien 150-3 und -4 lagen sie unter denen der Kontrollen.

Alle getesteten BWYV-infizierten Pflanzen wiesen eindeutige Symptome auf, wie etwa Zwergwuchs (Bild 23). Keine der getesteten Linien zeigte eine Immunität gegenüber einer BWYV-Infektion. Im Vergleich mit den infizierten, nicht-transgenen Kontrollpflanzen zeigten sich nach optischer Bonitur keine signifikanten Unterschiede. Die niedrigen ELISA-Werte für die transgenen Linien (wie z. B. Linie 150) korrelierten nicht signifikant mit einer geringeren Symptomausprägung (Daten werden nicht gezeigt).

Tabelle 10 Resistenztest mit F₂-Nachkommen RoIC 19,5k-Gen-transgener N. benthamiana-Linien

Die Samen der F₂ wurden im Gewächshaus ausgesät. Die Keimlinge wurden nach Bildung von zwei bis drei Laubblättern mit fünf bis sechs Virus-tragenden Blattläusen für zwei Tage besiedelt. Anschließend wurden die Blattläuse mit einem Insektizid getötet. Drei und sechs Wochen nach Infektion wurden mehrere Blattstücke aus der mittleren Pflanzenhöhe entnommen und durch Mörsern ein Extrakt gewonnen. Die Blattextrakte wurden 1 : 30 in ELISA-Probenpuffer verdünnt und der Virusgehalt im TAS-ELISA mit Hüllprotein-spezifischen Antikörpern bestimmt.

Linie	Anzahl der getesteten Nachkommen		ELISA-Wert E ₄₀₅	
	(drei	sechs Wochen p.i.)	(drei	sechs Wochen p.i.)
150 - 3	24	24	0,351	0,352
150 - 4	23	20	0,290	0,372
152 - 5	24	23	0,253	0,700
155 - 1	19	19	0,288	1,220
nicht-infizierte Pflanzen	4	4	0,012	0,087
Kontrolle	17	17	0,795	0,411

6.6 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung des P19,5k

Ob es sich beim P19,5k um ein Transportprotein handelt, das die virale RNA zu den Plasmodesmata leitet, sollte durch Lokalisierungsstudien des Proteins in der Zelle erhellt werden. Analog zu den Arbeiten von Heinlein (Heinlein et al., 1995) sollte ein chimäres 19,5k:gfp-Genkonstrukt hergestellt werden und die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins bestimmt werden. Anschließend sollten durch Mutationen innerhalb der 19,5k-Gensequenz Domänen charakterisiert werden, welche für eine Plasmodesmata-Lokalisierung verantwortlich sind.

Teile der Ergebnisse wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Axel Lütgering (Lütgering, 1997) erstellt. Diese Arbeiten umfassen die Klonierung der chimären Konstrukte und die transiente Expression in Protoplasten.

Die theoretischen und praktischen Grundlagen dazu wurden von mir entwickelt.

6.6.1 19,5k:GFP-Gen-Klonierungsstrategie für die subzelluläre Lokalisierung des P19,5k in Pflanzenzellen

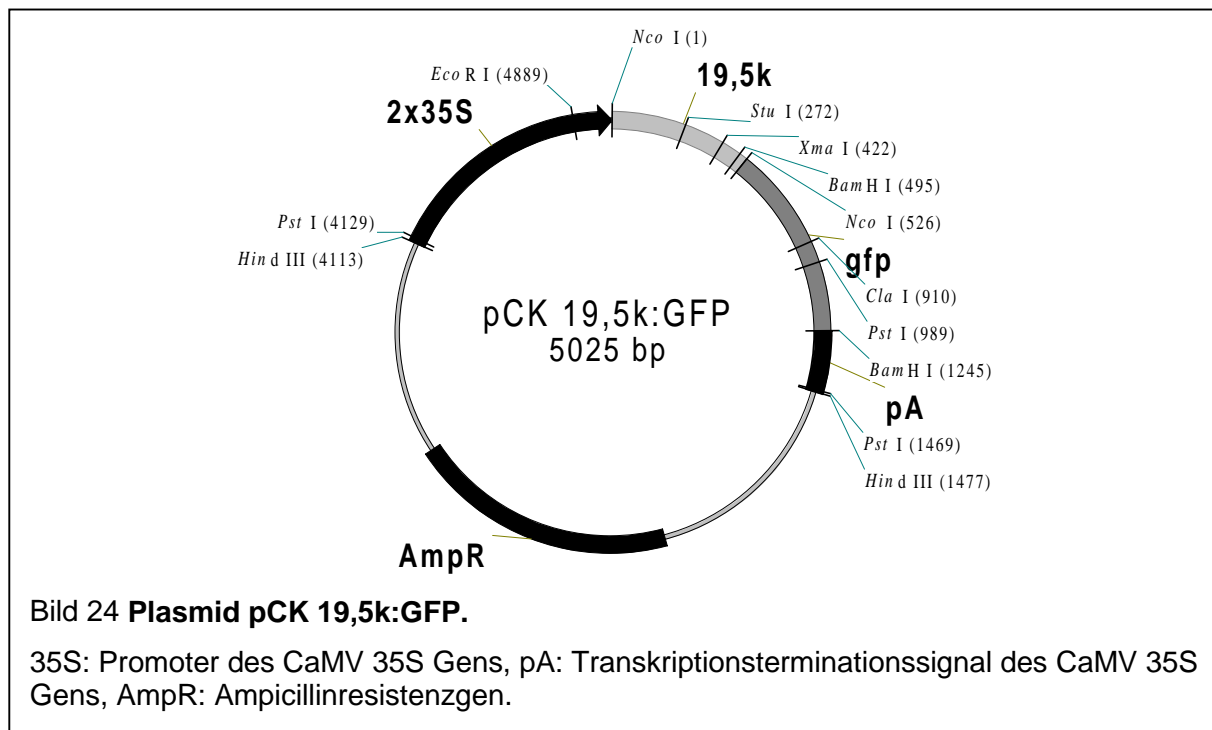
Zunächst wurde das 19,5k-Gen aus dem Plasmid pRT CP in einer mutagenisierenden PCR zur Herstellung von 5' und 3'-NcoI-Schnittstellen amplifiziert. Der verwendete 3'-Primer hatte folgende Sequenz:

19,5 3' NcoI:

5' - GTC TAG AGT CGC **CAT GGG** ATG AAG AAC CAC TGC - 3'

Die fettgedruckten Buchstaben kennzeichnen die NcoI-Schnittstelle. Als 5'-Primer diente der Primer 19,5k NcoI 5' (5.1.3.).

Nach der Isolierung des Gens und einem NcoI-Restriktionsverdau wurde das Fragment in das mit NcoI-geöffnete Plasmid pCK GFP S65C (Reichel et al., 1996) kloniert. Die richtige Orientierung des Leserasters zum gfp-Gen wurde mit einem BamHI-Verdau überprüft. Das Ergebnis der Klonierung war das Plasmid pCK 19,5k:GFP (Bild 24).



Als Kontrolle wurde das Plasmid pCK Δ19,5k:GFP entwickelt, in welchem ein Drittel des 19,5k-Gens in frame deletiert wurde. Am 3'-Ende der 19,5k-Gensequenz wurden 200 bp entfernt. Dazu wurde das Plasmid pCK 19,5k:GFP mit den Restriktionsendonukleasen StuI und XmaI geschnitten. Das größere Fragment wurde nach Agarose-Gelelektrophorese aus

dem Gel isoliert und die Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt. Der Vektor – pCK Δ 19,5k:GFP – wurde religiert und in *E. coli* transformiert.

In den folgenden Klonierungen sollten zwei α -helikale Domänen des P19,5k mutiert werden. Das P19,5k besitzt am N-Terminus ein SQWL- sowie ein DDDEE-Motiv (siehe dazu auch Bild 5 sowie Bild 42), welche innerhalb der luteoviralen P17k konserviert sind.

Das rekombinante Plasmid pCK 19,5k SQWL:GFP wurde mit Hilfe einer mutagenen Megaprimer-PCR hergestellt. In diesem Plasmid wurden die Kodone des SQWL-Motivs durch Alanin-kodierende Kodone ersetzt. Dazu wurde folgender 3'-Primer entwickelt, welcher die zu mutierende Sequenz umfaßt.

SQWL-MUT 3':

5' - CCC GAG AGG TTT GGA CCA **CGC CGC CGC GGC** GAG GGC GCT GAG
CGC GTC GTG - 3'

Die fettgedruckten Buchstaben kennzeichnen die mutierten Kodone (Alanin wird kodiert von GCN). Die unterstrichenen Buchstaben markieren eine neue SacII-Schnittstelle.

In der ersten PCR wurden der 19,5k 5'NcoI-Primer und der SQWL-MUT 3'-Primer verwendet. Als Zielsequenz für diese und die folgende PCR diente das 19,5k-Gen aus dem Plasmid pCK 19,5k:GFP. Das aufgereinigte PCR-Produkt bildete in der zweiten PCR den 5'-Primer. Den 3'-Primer bildete der Primer 19,5k 3'NcoI. Das erhaltene Fragment wurde isoliert und nach NcoI-Verdau in den NcoI-geöffneten Vektor pCK GFP S65C kloniert. Die Plasmide mit der richtigen Orientierung des 19,5k-Gens zum gfp-Gen wurden zur Kontrolle mit SacII verdaut.

Zur Herstellung des Plasmids pCK 19,5k DDDEE:GFP wurde im Prinzip wie oben beschrieben verfahren. In diesem Plasmid wurden die Kodone des DDDEE-Motivs ebenfalls durch Alanin-Kodone ersetzt. Die Sequenz des mutagenisierenden 3'-Primers lautet wie folgt.

DDDEE-MUT 3':

5' - CCT CTT GTC CGG TTG TTA **CCG CTG CGG CGG CGG CTA** GGT
CGG CGT TGT GTT GCC C - 3'

Die fettgedruckten Buchstaben kennzeichnen die mutierten Kodone. Die unterstrichenen Buchstaben markieren eine neue MspAI-Schnittstelle.

Die Einführung der Mutation konnte durch die neue MspAI-Schnittstelle überprüft werden. Bild 25 vergleicht die chimären 19,5k:gfp-Genkonstrukte. Die erfolgreiche Mutagenese konnte durch Sequenzierung im mutagenisierten Bereich bestätigt werden. Diese Sequenzierung war freundlicherweise im IPK Gatersleben von Frau König durchgeführt worden.

Die Expressionskassetten des gfp-Gens sowie der chimären 19,5k:gfp-Genkonstrukte (19,5k:GFP; Δ 19,5k:GFP; 19,5k SQWL:GFP und 19,5k DDDEE:GFP) wurden über einen HindIII-Verdau aus den entsprechenden Plasmiden isoliert und in den mit HindIII geöffneten pBIN19 kloniert. Die rekombinanten Plasmide pBIN GFP, pBIN 19,5k:GFP; und pBIN 19,5k DDDEE:GFP wurden in *A. tumefaciens* EHA 101 HV kloniert. Mit Hilfe der rekombinanten Agrobakterien wurden das gfp-Gen und die chimären 19,5k:gfp-Genkonstrukte in *N. tabacum* und *N. benthamiana* übertragen.

A $\Delta 19,5k:gfp$

C S R P T M S.....S Q S P G K G
 ~~~~~~  
 StuI ~~~~~~ XmaI  
 +260 T **GCTCAAGGCC** TACCATGAGT.. +412 ..TCACAAAGCC **CGGGAAAAGGG**  
 A **CGAGTTCCGG** ATGGTACTCA.. ..AGTGTTCGG **GCCCTTTTCCC**  
 ~~~~~~  
 ←———— deletiert —————→
 ~~~~~~  
 C S R P G K G  
 +260 T **GCTCAAGGCC** **GGGAAAAGGG**  
 A **CGAGTTCCGG** **CCCTTTTCCC**

**B** 19,5k SQWL:gfp

A L S Q W L W S K P  
 +43 GCCCTCAGC CAGTGGTTGT GGTCCAAACC T  
 CGGGAGTCG GTCACCAACA CCAGGTTTGG A  
 A L **A A A A** W S K P  
 ~~~~~~  
 SacII
 +43 GCCCT**CGCC** **GCGGCGGCGT** GGTCCAAACC T
 CGGGAG**CGG** **CGCCGCCGCA** CCAGGTTTGG A

C 19,5k DDDEE:gfp

D L D D D E E V
 +92 G ACCTAGACGA CGACGAAGAG GTA
 C TGGATCTGCT GCTGCTTCTC CAT
 D L **A A A A A** V
 ~~~~~~  
 MspAI  
 +92 G ACCTAG**CCGC** **CGCCGCAGCG** GTA  
 C TGGAT**CGGC** **GCGGCGTCGC** CAT

**Bild 25 19,5k:gfp-Gen-Mutanten**

**A.** Vergleich 19,5k:gfp-Genkonstrukt mit dem  $\Delta 19,5k:gfp$ -Genkonstrukt. oben: Ausschnitt aus der durch die Mutation betroffenen 19,5k-Gensequenz (19,5k:gfp). unten: Ergebnis der Deletion ( $\Delta 19,5k:gfp$ ). Die fettgedruckten Buchstaben kennzeichnen die nicht-deletierten Aminosäuren bzw. Nukleinsäuren. Der doppelseitige Pfeil markiert den Deletionsbereich.

**B. und C.** Vergleich des mutierten Bereichs zwischen 19,5k:gfp-Gen und 19,5k SQWL:gfp-Gen (B) und 19,5k DDDEE:gfp-Gen (C). Im 5'-Bereich des 19,5k-Gens wurden das SQWL sowie das DDDEE-Motiv mutiert (SQWL- $\rightarrow$ AAAA bzw. DDDEE- $\rightarrow$ AAAAA). Die fettgedruckten Buchstaben kennzeichnen die veränderten Sequenzen. Im 19,5k SQWL:GFP-Genkonstrukt wurde eine SacII-Restriktionsschnittstelle bzw. im 19,5k DDDEE:GFP-Genkonstrukt eine MspAI-Stelle eingeführt.

### 6.6.2 Lokalisierung der P19,5k:GFP-Fusionsproteine nach transienter Expression in Pflanzenzellen

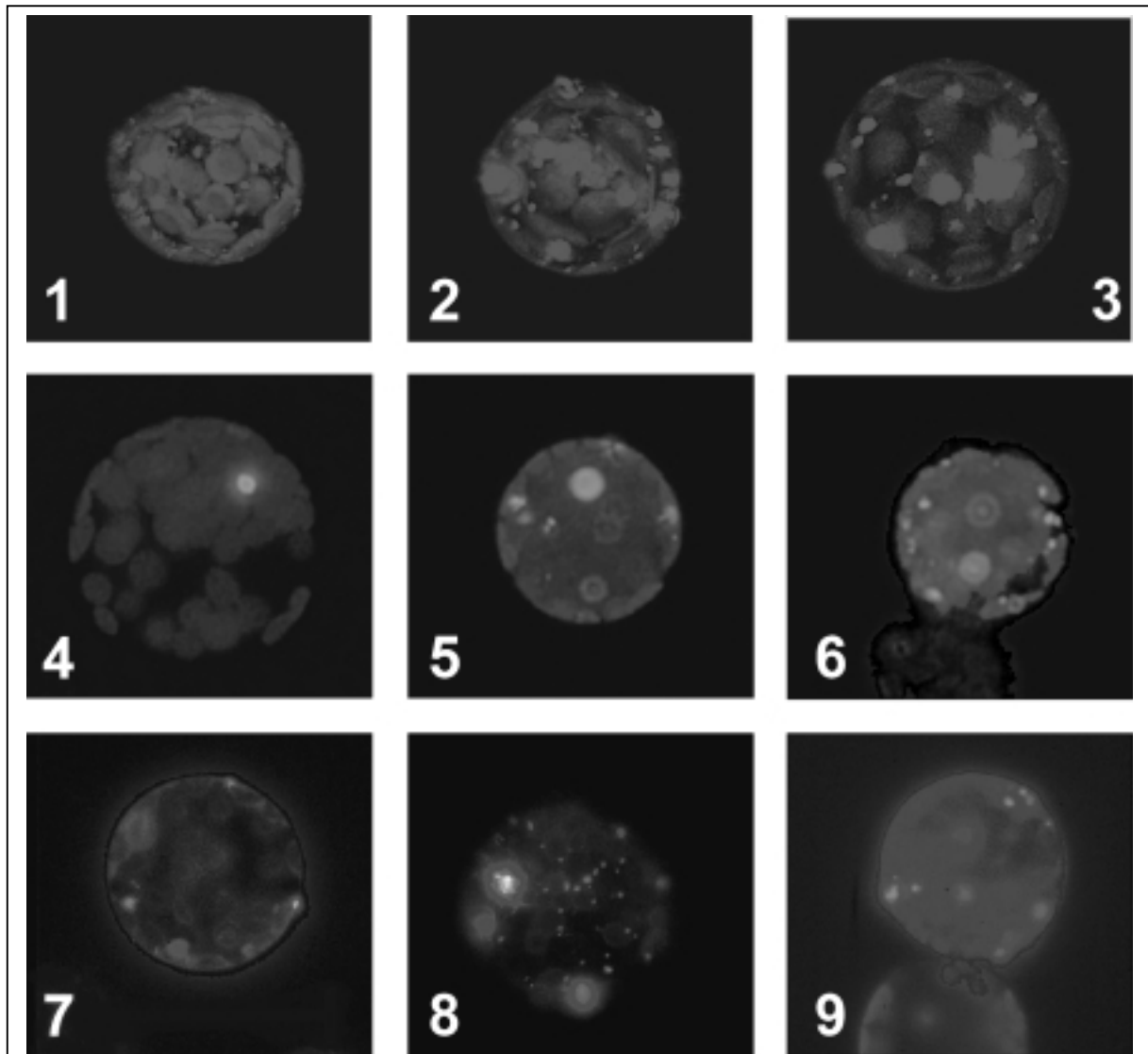
In den ersten Untersuchungen stand die transiente Expression der Fusionsproteine im Vordergrund.

Mesophyll-Protoplasten wurden mit dem chimären 19,5k:gfp-Genkonstrukt (pCK 19,5k:GFP) elektroporiert. Die Protoplasten wurden von A. Lütgering aus *N. tabacum* und *N. benthamiana* isoliert. Die Protoplasten wurden 16 - 36 h nach Transfektion in einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Die 19,5k:gfp-Gen-transfizierten Protoplasten zeigten eine Fluoreszenz des GFP in distinkten Punkten, welche offensichtlich an der Zelloberfläche lokalisiert waren (Bild 26 Aufnahmen 1 - 9). Die Zahl der Punkte schwankte zwischen einem und mehr als 20, betrachtet bei 400facher Vergrößerung. In einigen Protoplasten leuchteten sehr große Strukturen (Bild 26, Aufnahme 4 und Bild 27), welche aber die Ausnahme blieben. Untersuchungen mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (CLSM) bestätigten, daß die fluoreszierenden Punkte auf der Zelloberfläche lagen und meist einen Durchmesser von ca. 1,5 µm besaßen (Bild 26, Aufnahmen 1 – 3 und Bild 27). In Protoplasten, welche mit dem Plasmid pCK GFP S65C transfiziert worden waren, war das GFP diffus im Zytoplasma mit einer Akkumulation im Zellkern lokalisiert (Bild 31, links oben). Die Lokalisierung des P19,5k:GFP-Fusionsproteins an der Oberfläche der Protoplasten-Zellmembran änderte sich während des Beobachtungszeitraumes von 16 bis 36 h nicht. Es gab keinen Unterschied zwischen transfizierten *N. tabacum*- und *N. benthamiana*-Protoplasten. (Daten werden nicht gezeigt).

Nach Beschuß von *N. benthamiana*-Epidermiszellen mit dem Plasmid pCK 19,5k:GFP tritt nach ca. 16 h eine starke punktartige Lokalisierung in Zellwandnähe auf (Bild 28 Aufnahmen 1 - 8). Zudem konnte auch in einigen Fällen innerhalb der Zellen, vermutlich in der Nähe des Zellkerns oder im Zellkern, eine Fluoreszenz beobachtet werden (z. B. Bild 28, Aufnahme 2). In einigen wenigen Zellen wurden auch fluoreszierende Strukturen innerhalb der Zellen detektiert (Daten werden nicht gezeigt). Die Bedeutung dieser Strukturen muß noch geklärt werden. Fluoreszierende Strukturen in der Zellwand von Nachbarzellen konnten nicht gefunden werden.

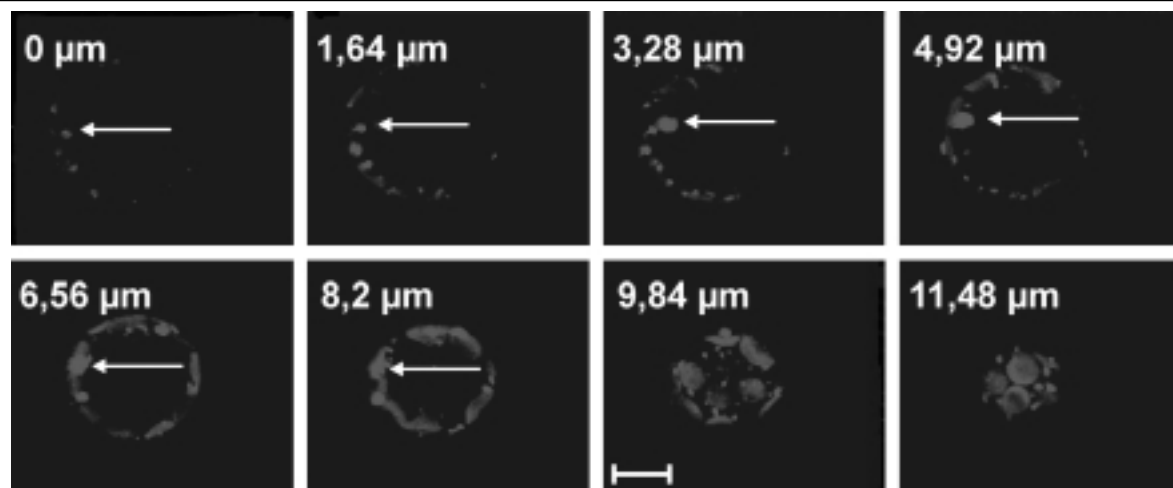
GFP-exprimierende Zellen zeigten eine diffuse Fluoreszenz innerhalb der Zellen mit einer deutlich stärkeren Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns (Bild 28 Aufnahme 9).



**Bild 26 Aufnahmen von 19,5k:gfp-Gen-transfizierten Tabak-Protoplasten.**

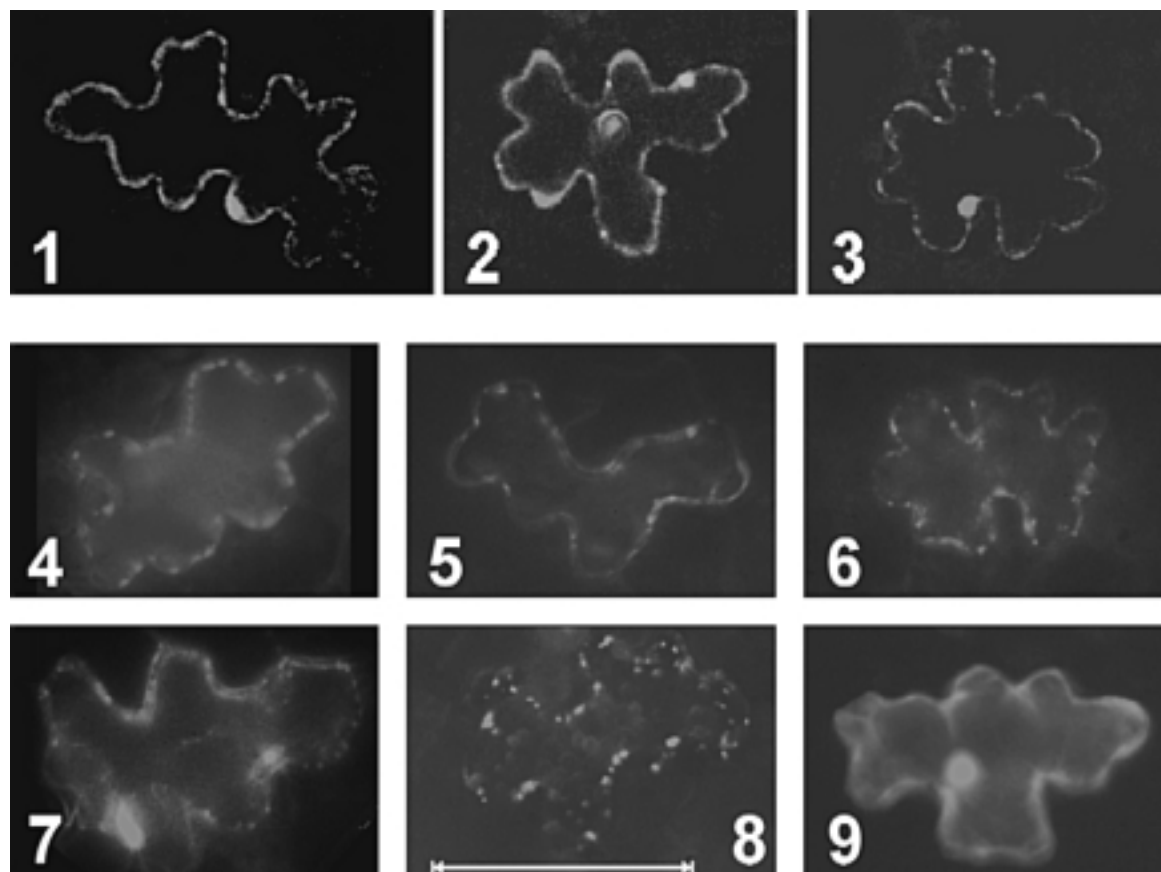
Die Aufnahmen entstanden ca. 24 h nach Elektroporation. Die Aufnahmen 1 - 3 entstanden mit einem CLSM, die Aufnahmen 4 - 9 mit einem Fluoreszenzmikroskop. Die Protoplasten haben eine durchschnittliche Größe von 40  $\mu\text{m}$ . Das P19,5k:GFP-Fusionsprotein wurde an der Oberfläche der Protoplastenmembran lokalisiert.





**Bild 27 Aufnahmen von einem 19,5k:gfp-Gen-transfizierten Tabak-Protoplasten.**

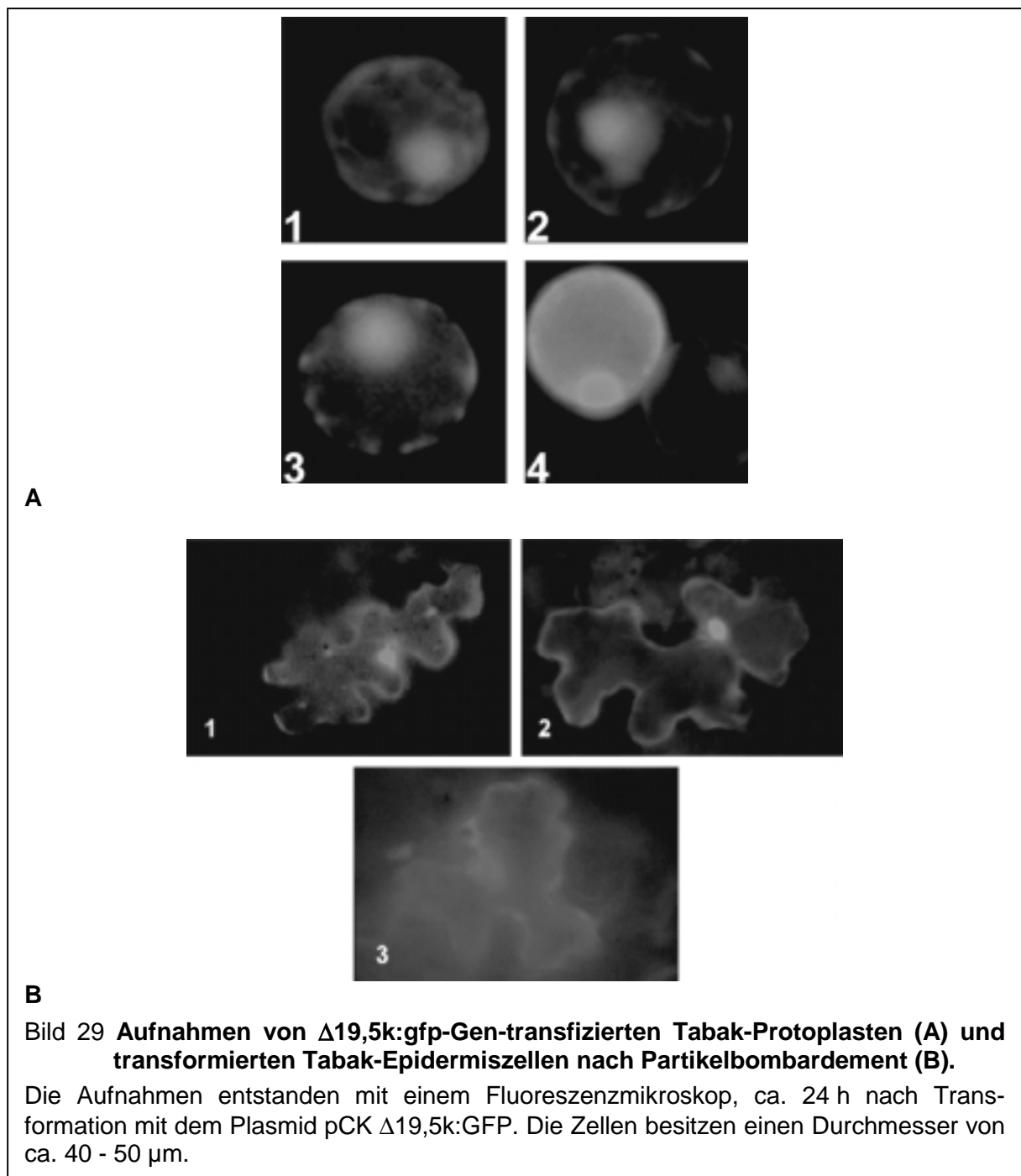
Die Aufnahmen entstanden in 1,64 µm-Schritten - beginnend ungefähr in der Mitte des Protoplasten - ca. 24 h nach Elektroporation mit einem CLSM. Der Pfeil in den einzelnen Aufnahmen weist exemplarisch auf eine durchgehende, fluoreszierende Struktur hin. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 µm.



**Bild 28 Aufnahmen von 19,5k:gfp-Gen-transformierten Tabak-Epidermiszellen nach Partikelbombardement.**

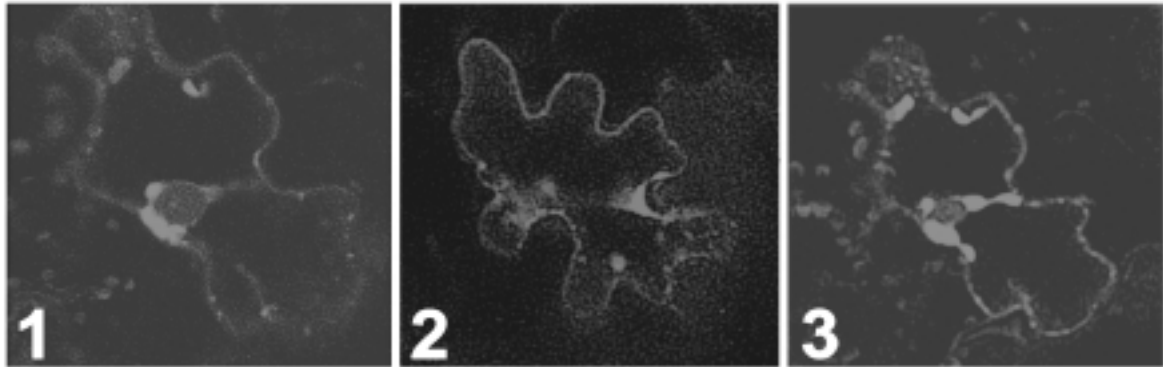
Die Aufnahmen 1 - 3 entstanden mit einem CLSM, die Aufnahmen 4 - 9 mit einem Fluoreszenzmikroskop, ca. 24 h nach Partikelbombardement mit dem Plasmid pCK 19,5k:GFP (Aufnahmen 1 - 8) bzw. pCK GFP S65C (Aufnahme 9). Der Maßstabsbalken der Aufnahme 8 entspricht 50 µm.

Um zu zeigen, daß tatsächlich das P19,5k und nicht die Veränderung des GFP durch die Fusion für die Lokalisierung des chimären Proteins verantwortlich ist, wurde eine Mutante erzeugt, in der das P19,5k durch eine Deletion ein Drittel seiner Aminosäuren einbüßt (pCK  $\Delta$ 19,5k:GFP). Protoplasten, welche mit diesem Plasmid transfiziert worden waren, zeigten eine diffuse Fluoreszenz (Bild 29 A Aufnahmen 1 – 4 und Bild 31, rechts unten). Die Verteilung des Fusionsproteins in der Zelle entspricht dem des GFP. Die Stärke der Fluoreszenz scheint aber geringer zu sein.  $\Delta$ 19,5k:gfp-Gen-transformierte *N. benthamiana*-Epidermiszellen nach Partikelbombardement zeigten ebenfalls eine diffuse Fluoreszenz mit der typischen Kernlokalisierung des GFP (Bild 29 B, Aufnahmen 1 - 3). Das deletierte, chimäre Fusionsprotein hat offensichtlich seine Zellwandlokalisierungsfunktion verloren. Um den Einfluß von Motiven innerhalb des N-Terminus zu untersuchen, wurden zwei weitere Mutanten hergestellt. Die Herstellung und Art dieser Mutanten wurde unter 6.6.1 beschrieben.



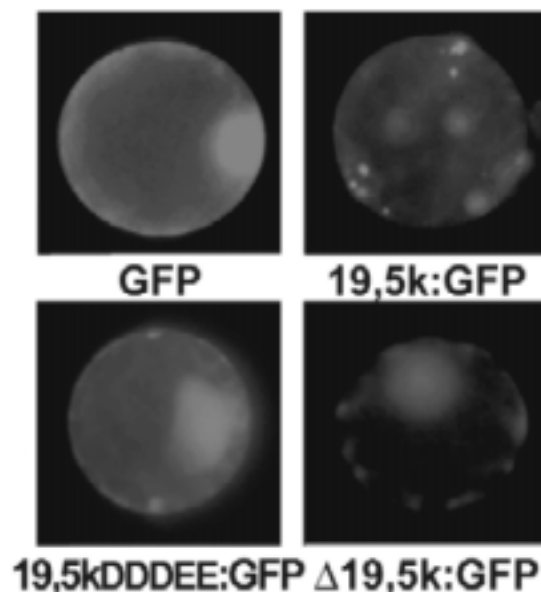
Die Mutation des SQWL-Motivs zu AAAA (pCK 19,5 SQWL:GFP) führte nach transienter Expression in Pflanzenzellen zu keiner Änderung der Lokalisierung des chimären, mutierten Proteins (Daten werden nicht gezeigt).

Wenn hingegen Protoplasten mit dem Plasmid pCK 19,5k DDDEE:GFP transfiziert wurden, ging die punktartige Lokalisierung des Fusionsproteins verloren (Bild 31, links unten). Das P19,5k DDDEE:GFP war in der Zelle mehr oder weniger diffus verteilt, und offensichtlich gab es noch eine gewisse Aggregation an Zellstrukturen. In CLSM-Aufnahmen nach Partikelbombardement zeigten die Epidermiszellen eine schwache punktartige Fluoreszenz in der Nähe der Zellwand und eine stärkere Fluoreszenz innerhalb von Zellstrukturen, meist ausgehend vom Zellkern (Bild 30).



**Bild 30 Aufnahmen von 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transformierten Tabak-Epidermiszellen nach Partikelbombardement.**

Die Aufnahmen entstanden mit einem CLSM ca. 24 h nach Beschuß. Die Zellen besitzen eine durchschnittliche Länge von 50 µm.



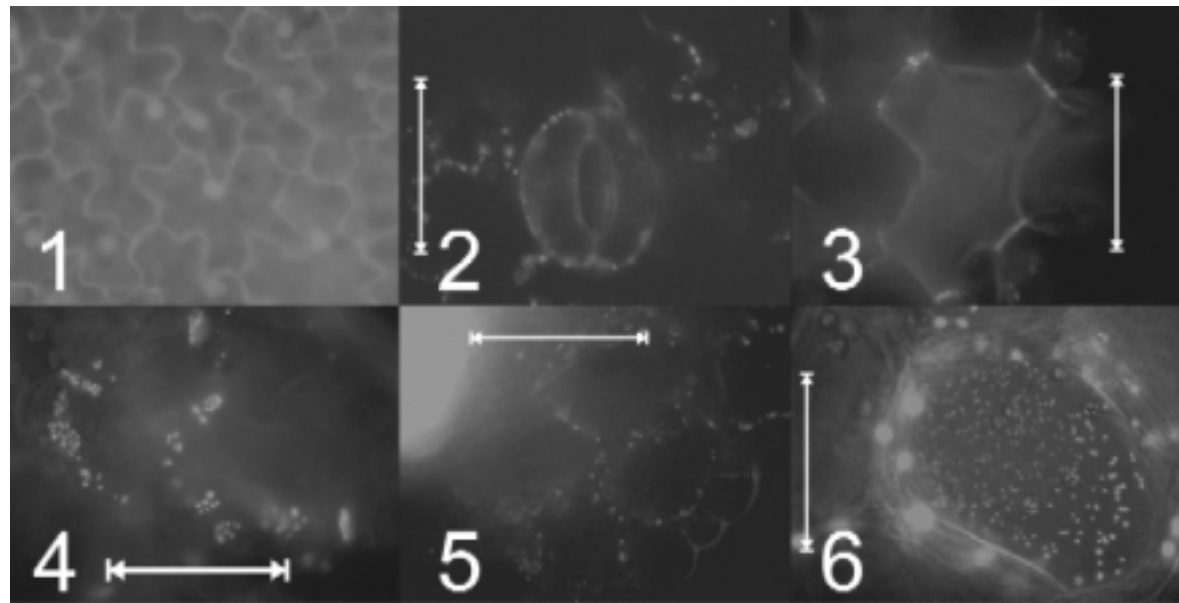
**Bild 31 Aufnahmen von Tabak-Protoplasten, transfiziert mit verschiedenen (chimären 19,5k:) GFP-Genkonstrukten.**

Die Aufnahmen entstanden ca. 24 h nach Elektroporation. Die in den Protoplasten exprimierten Konstrukte werden unterhalb der einzelnen Aufnahmen genannt. Die Protoplasten besaßen eine durchschnittliche Größe von 40 µm.

### 6.6.3 Lokalisierung des P19,5k:GFP-Fusionsproteins in stabil transformierten Pflanzen

Die Transformation von *N. tabacum* und *N. benthamiana* mit dem pBIN GFP, pBIN 19,5k:GFP und dem pBIN 19,5k DDDEE:GFP erfolgte durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer. Die transgenen Pflanzen wurden im Fluoreszenzmikroskop, im CLSM, durch Immuno-Gold-Markierung sowie durch differentieller Zentrifugation untersucht. Zwischen *N. tabacum* und *N. benthamiana* konnte kein Unterschied in der subzellulären Lokalisierung festgestellt werden (Daten werden nicht gezeigt).

In gfp-Gen-transgenen Tabakpflanzen war die Fluoreszenz diffus innerhalb der Zelle sichtbar (Bild 32, Aufnahme 1) mit der typischen Kernakkumulation.



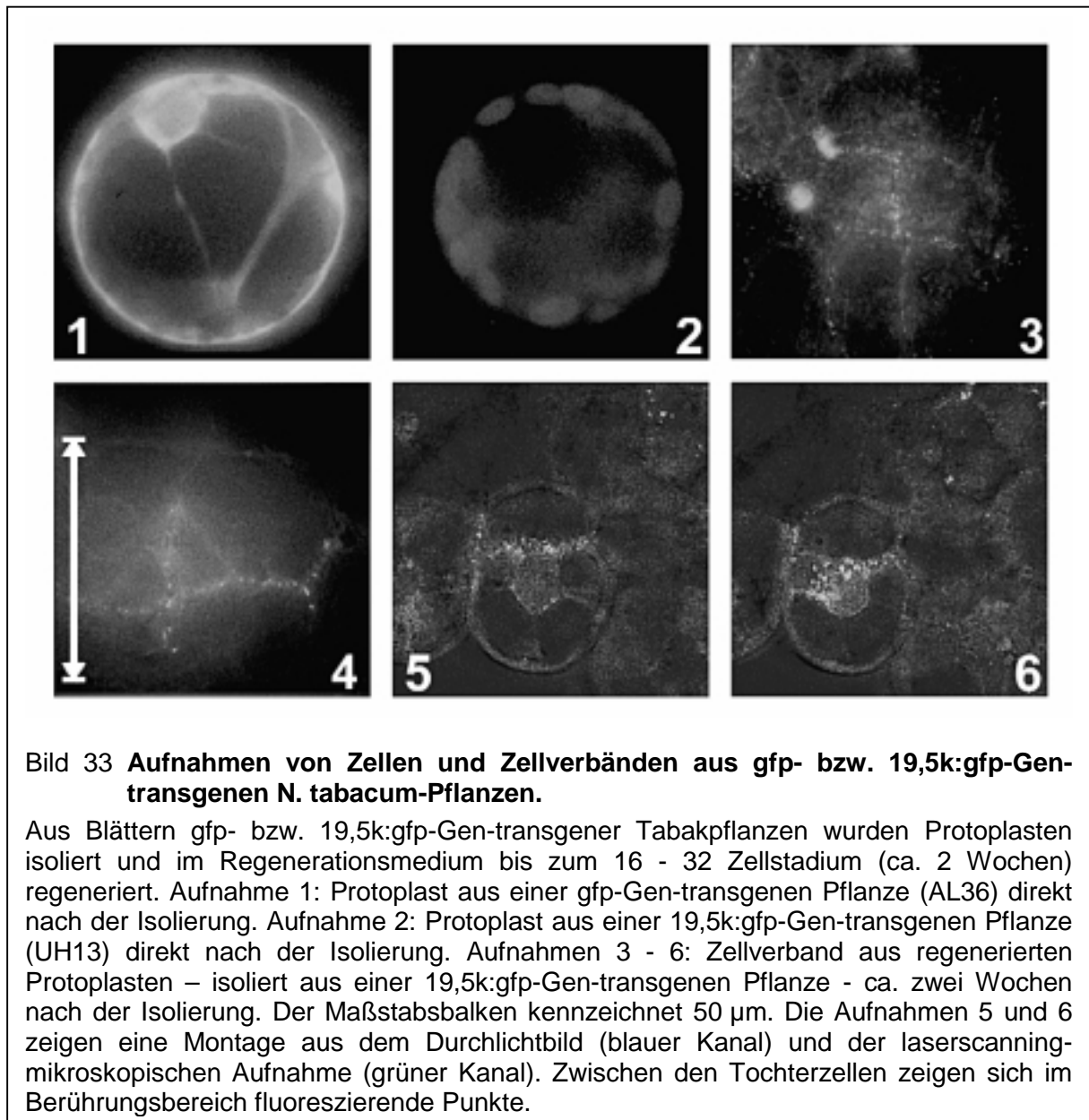
**Bild 32 Aufnahmen aus gfp- bzw. 19,5k:gfp-Gen-transgenen *N. tabacum*-Pflanzen.**

Aufnahme 1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Epidermiszellen einer gfp-Gen-transgenen Pflanze (in 100facher Vergrößerung, AL36). Das GFP wird innerhalb der Zelle in einem zytosolischen Band lokalisiert, welches dicht entlang der Zellwand verläuft. Auffällig die Akkumulation des GFP im Zellkern (runde Strukturen innerhalb der Zellen)). Aufnahmen 2 - 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Zellen 19,5k:gfp-Gen-transgener Pflanzen (UH11, UH13 und UH19). Aufnahme 2: Epidermiszellen in der Aufsicht. Aufnahme 3: Mesophyllzellen des Schwammparenchyms. Aufnahme 4: Blick auf die Grenze Epidermis/Mesophyll. Aufnahme 5: Querschnitt durch einen Stengel; links oben zu sehen ist ein Teil des Xylems, welches eine starke Autofluoreszenz aufweist. Aufnahme 6: Ebene zwischen zwei Parenchymzellen des Stengels. Die Maßstabsbalken kennzeichnen 50 µm.

In den 19,5k:gfp-Gen-transgenen Tabakpflanzen (Linien UH11, UH13 und UH19) ließ sich eine punktförmige Fluoreszenz innerhalb der Zellwände erkennen (Bild 32 Aufnahmen 2 - 6). Beim Übergang von einer Epidermiszelle zu einer Mesophyllzelle ließen sich kreisförmige Anhäufungen von fluoreszierenden Punkten entdecken (Bild 32 Aufnahme 4). Im Mesophyll zeigte sich die Fluoreszenz in Zellwandbereichen zwischen den Berührungstellen zweier Nachbarzellen (Bild 32 Aufnahme 3). Im Stengelquerschnitt hatten alle Zellen des Parenchyms die oben beschriebene punktförmige Fluoreszenz (Bild 32 Aufnahme 5). Wurde auf eine bestimmte horizontale Ebene innerhalb der Parenchymzellen fokussiert, fluoreszierten dort viele punktförmige Strukturen, vermutlich wurde der Zell-zu-Zell-Übergang getroffen (Bild 32, Aufnahme 6). Interessanterweise zeigten die Schließzellen ebenfalls punktförmige Strukturen entlang ihrer Zellgrenze zu den Epidermiszellen (Bild 32, Aufnahme 2). Anhand der Mesophyllzellen (Bild 32, Aufnahme 3) wurde besonders deutlich, daß sich die Lokalisierung des Fusionsproteins offensichtlich nur auf solche Zellwandbereiche erstreckt,

welche durch Plasmodesmata in Kontakt mit anderen Zellen stehen. Das Fusionsprotein wird vermutlich in Plasmodesmata lokalisiert.

Um die Hypothese der PD-Lokalisierung des P19,5k:GFP in transgenen Pflanzen zu überprüfen, wurden zwei Methoden gewählt. Bei dem ersten handelt es sich um einen direkten Nachweis – der Isolierung und der Regeneration von Protoplasten aus einer 19,5:gfp-Gen-transgenen Pflanze. Befindet sich das Fusionsprotein innerhalb der Zellwand, sollten die Protoplasten, denen die Zellwand fehlt, keine fluoreszierenden Punkte zeigen. Weiterhin sollten innerhalb der Mikrokalli nur fluoreszierende Punkte zwischen den gemeinsamen Zellwandbereichen zweier Tochterzellen zu finden sein.

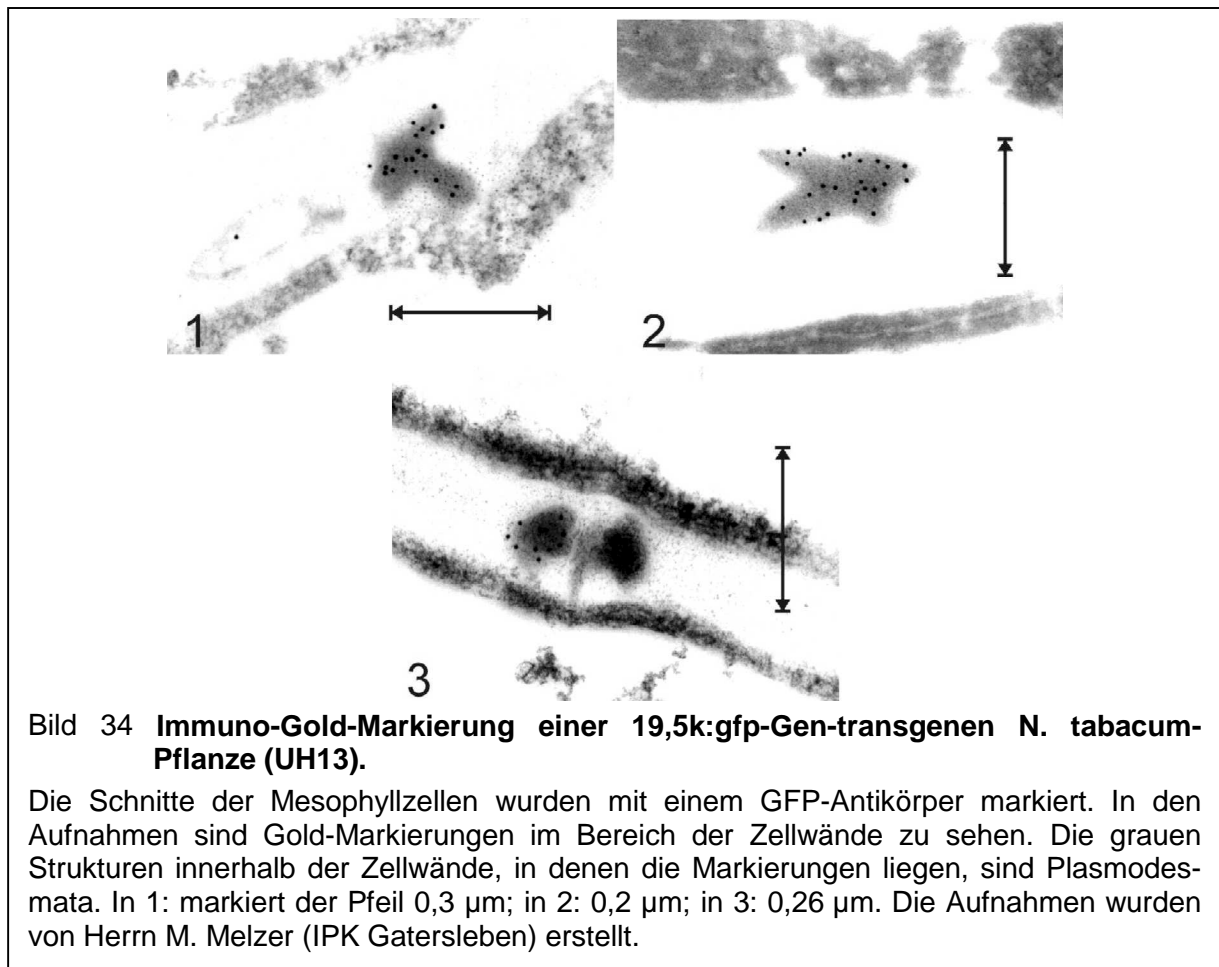


**Bild 33 Aufnahmen von Zellen und Zellverbänden aus gfp- bzw. 19,5k:gfp-Gen-transgenen *N. tabacum*-Pflanzen.**

Aus Blättern gfp- bzw. 19,5k:gfp-Gen-transgener Tabakpflanzen wurden Protoplasten isoliert und im Regenerationsmedium bis zum 16 - 32 Zellstadium (ca. 2 Wochen) regeneriert. Aufnahme 1: Protoplast aus einer gfp-Gen-transgenen Pflanze (AL36) direkt nach der Isolierung. Aufnahme 2: Protoplast aus einer 19,5k:gfp-Gen-transgenen Pflanze (UH13) direkt nach der Isolierung. Aufnahmen 3 - 6: Zellverband aus regenerierten Protoplasten – isoliert aus einer 19,5k:gfp-Gen-transgenen Pflanze - ca. zwei Wochen nach der Isolierung. Der Maßstabsbalken kennzeichnet 50 µm. Die Aufnahmen 5 und 6 zeigen eine Montage aus dem Durchlichtbild (blauer Kanal) und der laserscanning-mikroskopischen Aufnahme (grüner Kanal). Zwischen den Tochterzellen zeigen sich im Berührungsbereich fluoreszierende Punkte.

Die Protoplasten wurden aus Blättern einer 19,5k:gfp-Gen-transgenen Tabakpflanze (Linie UH13) isoliert. Die Protoplasten zeigten keine fluoreszierenden, punkartigen Strukturen (Bild 33 Aufnahme 2). In der Zellwandfraktion konnten zahlreiche Zellfragmente mit fluoreszierenden, punkartigen Strukturen beobachtet werden (Daten werden nicht gezeigt). Durch den enzymatischen Abbau der Zellwand wurde also das Fusionsprotein entfernt. In einem Zeitraum von zwei bis sieben Tagen, in denen sich die Protoplasten regenerierten und sich teilen konnten, wurde keine Fluoreszenz festgestellt. Im Laufe der zweiten Woche ließen sich fluoreszierende Punkte zwischen den sich gebildeten Tochterzellen in gemeinsamen Zellwandbereichen entdecken (Bild 33, Aufnahmen 3 - 6).

Um auszuschließen, daß die GFP-Fluoreszenz durch die Protoplastierung verloren geht, wurden aus einer gfp-Gen-transgenen Tabakpflanze (Linie AL36) ebenfalls Protoplasten isoliert. In diesen Protoplasten ließ sich eine deutliche GFP-Fluoreszenz entdecken (Bild 33, Aufnahme 1).



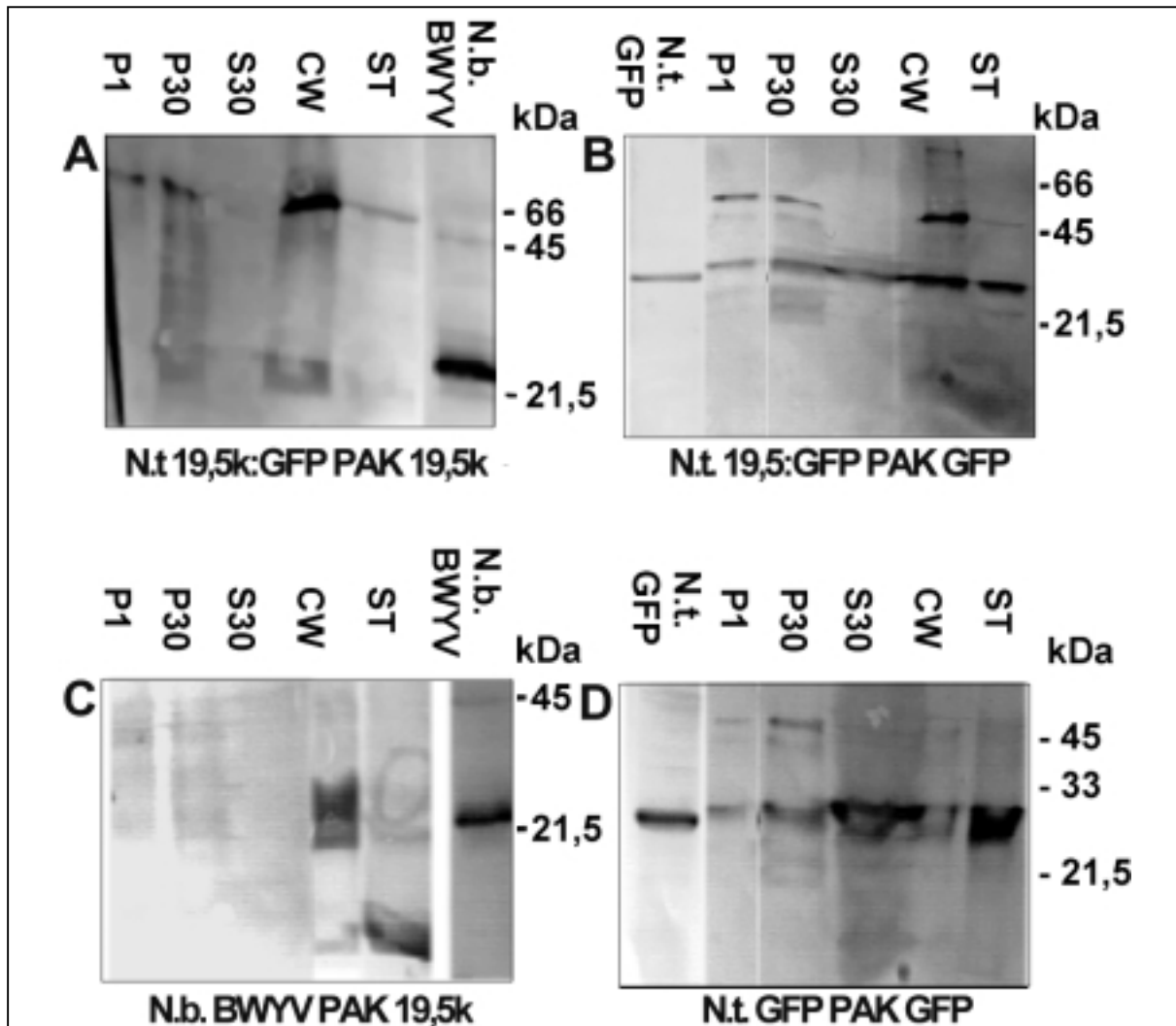
**Bild 34 Immuno-Gold-Markierung einer 19,5k:gfp-Gen-transgenen *N. tabacum*-Pflanze (UH13).**

Die Schnitte der Mesophyllzellen wurden mit einem GFP-Antikörper markiert. In den Aufnahmen sind Gold-Markierungen im Bereich der Zellwände zu sehen. Die grauen Strukturen innerhalb der Zellwände, in denen die Markierungen liegen, sind Plasmodesmata. In 1: markiert der Pfeil 0,3 µm; in 2: 0,2 µm; in 3: 0,26 µm. Die Aufnahmen wurden von Herrn M. Melzer (IPK Gatersleben) erstellt.

In der zweiten Methode wurde eine stark fluoreszierende 19,5k:gfp-Gen-transgene Tabakpflanze (UH13) durch M. Melzer am IPK Gatersleben mittels Immuno-Gold-Markierung untersucht. Er verwendete zwei Antikörper - den P19,5k-Antikörper (siehe dazu 6.4) und einen kommerziellen GFP-Antikörper. Mit beiden konnte er eine Lokalisierung der Goldpartikel innerhalb der Plasmodesmata feststellen. In Bild 34 wird die Lokalisierung des Fusionsprotein nach GFP-Antikörper Inkubation gezeigt.

Neben der Antikörpermarkierung in Pflanzengewebeschnitten kann die Verteilung eines Pflanzenvirus-Transportproteins innerhalb einer Pflanzenzelle auch durch eine differentielle Zentrifugation eines Extraktes ermittelt werden. Das Blattmaterial einer 19,5k:gfp-Gen- (Linie UH13), einer gfp-Gen- (Linie AL36) transgenen Tabakpflanze und einer BWYV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze wurde in einer differentiellen Zentrifugation zur Anreicherung der Proteine aus den verschiedenen Zellkompartimenten aufgearbeitet. Diese Fraktionen waren angereichert an Kernen und Chloroplasten (P1), Membranstrukturen und Mitochondrien (P30), Zytosol (S30) und Zellwand-assoziierten Proteinen (CW). Proteine von vorher nicht aufgeschlossenen Zellen und restlichem Membranmaterial wurden in der mit Triton X-100 (nicht-ionisches Detergenz) extrahierten Fraktion (ST) erwartet. Extraktaliquots des Blattmaterials wurden durch PAA-Gelelektrophorese getrennt und auf eine PVDF-Membran für die Western-Blot-Analyse transferiert. Das P19,5k:GFP-Fusionsprotein wurde nach Inkubation der Membran mit dem P19,5k-Antikörper hauptsächlich in der CW-Fraktion detektiert (Bild 35 A). Daneben wurde das Protein auch in der P1-, P30-Fraktion und schwächer in der ST-Fraktion nachgewiesen. Das chimäre Protein sollte ein kalkuliertes Molekulargewicht von 46,5 kDa besitzen. Tatsächlich läuft das Protein auf einer Höhe von

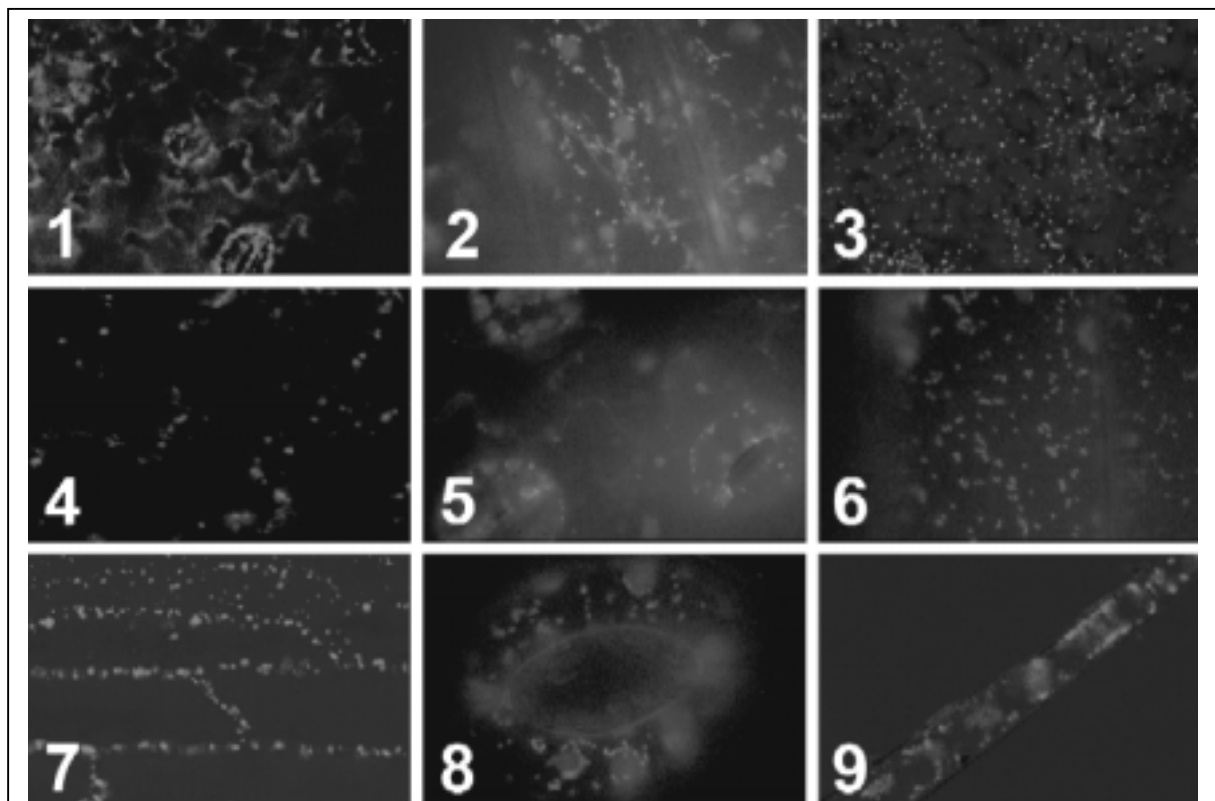
ca. 50 kDa, was vermutlich auf die posttranskriptionelle Modifikation des P19,5k zurückzuführen ist. Weitere Banden fanden sich auf der Höhe von ca. 22 kDa in der CW und in der P30-Fraktion. Wurde der Blot (Bild 35 B) mit einem GFP-Antikörper inkubiert, zeigte sich in allen Fraktionen eine Bande bei ca. 28 kDa (oberhalb der GFP-Bande). Daneben traten in den Fraktionen P1, P30 und CW Banden in Höhe des Fusionsproteins auf. Vermutlich handelt es sich bei den kleineren Banden um das komplette GFP-Molekül, welches - durch vermutlich sterische Spannungen an der Grenzregion zwischen P19,5k und GFP - von P19,5k:GFP abgespalten worden ist. Das GFP wurde in einer gfp-Gen-transgenen Pflanzen ebenfalls in allen Fraktionen lokalisiert (Bild 35 D). In der BWYV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze wurde das P19,5k fast ausschließlich in der CW-Fraktion nachgewiesen.



**Bild 35 Subzelluläre Lokalisierung des chimären Fusionsproteins P19,5k:GFP, des P19,5k und des GFP.**

PAGE-Trennung der durch differentielle Zentrifugation angereicherten Fraktionen P1 (Kerne und Chloroplasten), P30 (Membranen und Mitochondrien), S30 (lösliche Proteine), CW (Zellwandproteine) und ST (Triton-extrahierte Proteine). Proteinextrakte aus einer 19,5k:gfp-Gen-transgenen (A und B), einer BWYV-infizierten (C) und einer gfp-transgenen Tabakpflanze (D) wurden in einem 13,5 % SDS-PAA-Gel getrennt, elektrogeblottet auf eine PVDF-Membran und mit P19,5k (A und C) bzw. GFP-Antikörpern (B und D) inkubiert. Nach Inkubation mit einem AP-konjugierten Antikörper, welcher gegen den ersten gerichtet war, wurde der Blot mit dem Farbsubstrat (NBT und BCIP) entwickelt. Als Kontrollen wurden Gesamtproteinextrakte aus einer BWYV-infizierten *N. benthamiana*-Pflanze und einer gfp-Gen-transgenen *N. tabacum*-Pflanze verwendet (wie über den Spuren bezeichnet). PAK: polyklonaler Antikörper

19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgene Pflanzen (Linien UH39 und UH66) zeigten in den Zellen verschiedenartig fluoreszierende Strukturen (Bild 36). In Epidermiszellen konnte eine Überlagerung der GFP-Fluoreszenz mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten gefunden werden (Daten werden nicht gezeigt). In den Blatthaaren, den Epidermiszellen der Adern sowie den Schließzellen wurden deutlich stäbchenartige, fluoreszierende Strukturen erkannt (Bild 36, Aufnahme 6 - 9). In einigen Zellen konnte eine lineare Anordnung dieser Strukturen beobachtet werden (Bild 36 Aufnahme 2). In den Schließzellen ordneten sich die Stäbchen rund um die Chloroplasten an, ohne sie voll zu umschließen (Bild 36 Aufnahme 8). Eine Lokalisierung fluoreszierender, punktförmiger Strukturen innerhalb der Zellwand wurde nicht detektiert. Vermutlich handelt es sich bei den kleineren Strukturen - übereinstimmend mit der Größe und Verteilung - um Mitochondrien, welche häufig in Assoziation mit Chloroplasten und an Actinfilamenten vorkommen (persönliche Auskunft H.-P. Braun, Uni Hannover).

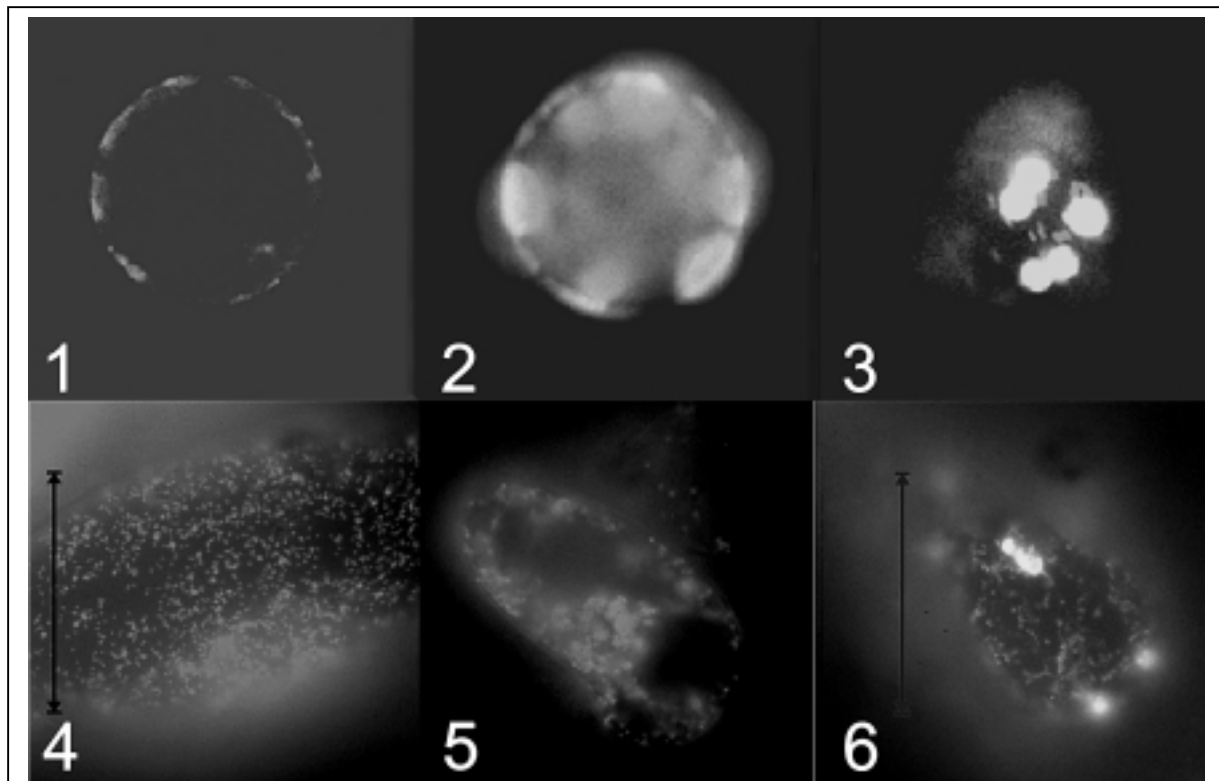


**Bild 36 Aufnahmen von 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgenen Tabak-Pflanzen.**

Aufnahmen 1, 2, 4 - 6 und 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Blattzellen 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgener Pflanzen (UH39 und UH66). Aufnahmen 3, 7 und 9: CLSM-Aufnahmen, Montage des Durchlichtbildes (im blauen Kanal) und des CLSM-Bildes (grüner Kanal). Die Aufnahmen zeigen Blattzellen – Epidermiszellen, Schließzellen (Aufnahme 8) und eine Zelle des Blatthaares (Aufnahme 9). Die Zellen besitzen eine durchschnittliche Größe von 50 µm.

Für das 19,5k DDDEE:gfp-Genkonstrukt sollte folgende Hypothese mittels der Protoplastenregeneration überprüft werden: Falls die fluoreszierenden Strukturen innerhalb der Zelle lokalisiert sein sollten, müßten sie nach Isolierung der Protoplasten weiterhin sichtbar sein. Aus einer 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgenen Pflanze (Linie UH39) mit deutlich sichtbarer Fluoreszenz wurden aus Blättern Protoplasten isoliert. Diese Protoplasten zeigten direkt nach Überführung ins Regenerationsmedium eine Fluoreszenz innerhalb der Zelle. Die Autofluoreszenz der Chloroplasten überlagerte sich mit der Fluoreszenz des GFP-Fusionsproteins (Bild 37 Aufnahmen 2 und 3). Ebenfalls wurden in den Protoplasten die stäbchenartigen Strukturen wiederentdeckt (Bild 37 Aufnahme 3). Nach zwei Wochen wurden einzelne Zellverbände im Fluoreszenzmikroskop untersucht. In den Zellen ließen sich kleine fluoreszierende Strukturen beobachten (Bild 37 Aufnahme 4); ähnlich wie in den transgenen

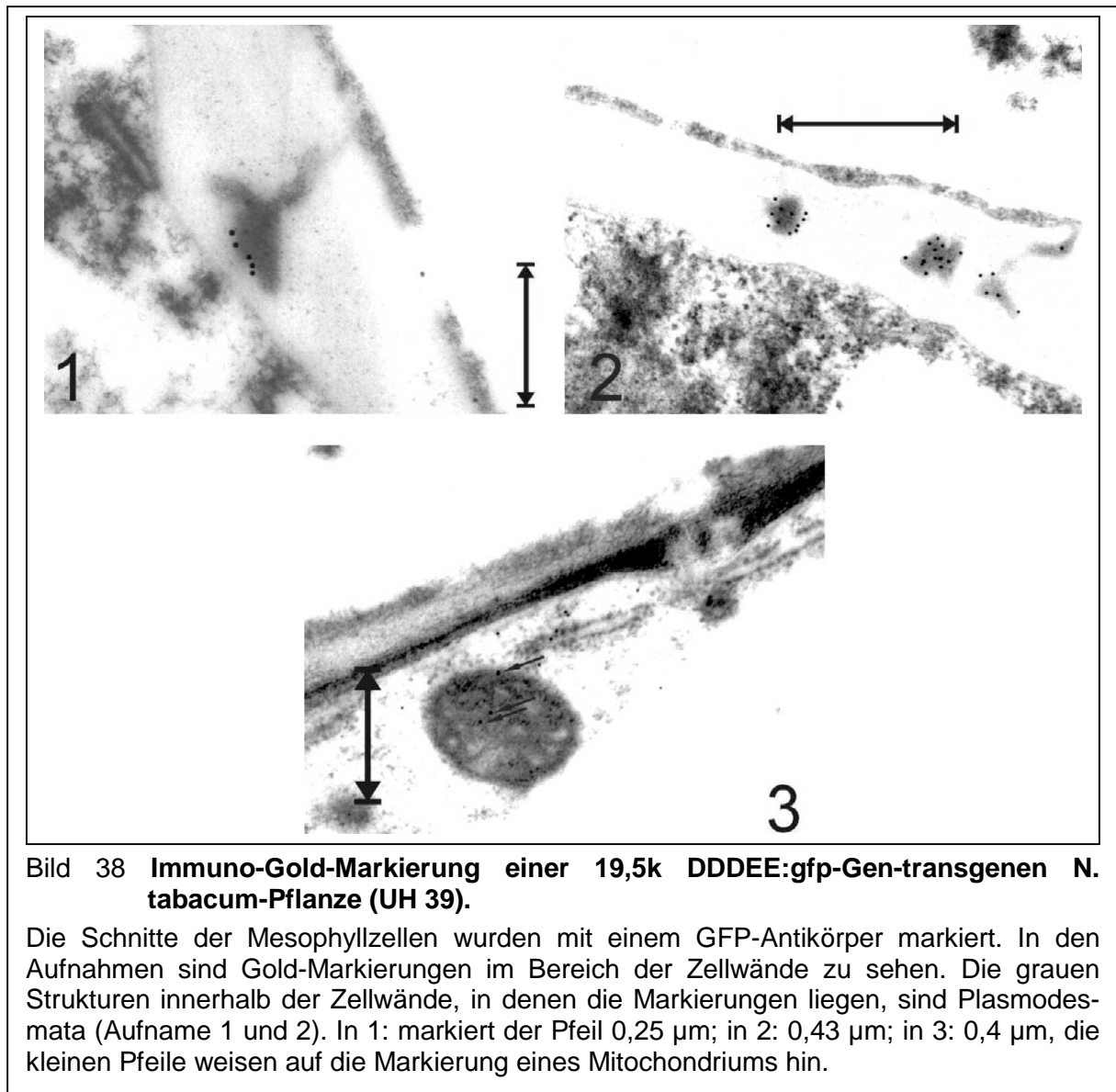




**Bild 37 Aufnahmen von Zellen und Zellverbänden aus einer 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgenen *N. tabacum*-Pflanze.**

Die Aufnahmen entstanden mit dem Fluoreszenzmikroskop. Aufnahme 1, 2 und 3: Protoplasten aus einer 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgenen Pflanze (UH39) direkt nach der Isolierung. Aufnahmen 4 - 6: Zellen aus Mikrokalli der regenerierten Protoplasten – isoliert aus einer 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgenen Pflanze (UH39) - ca. zwei Wochen nach der Isolierung. Die Maßstabsbalken kennzeichnen 50 µm. Die Aufnahmen 2, 3 und 6 entstanden ohne Bandpassfilter – die Autofluoreszenz der Chloroplasten wird daher nicht vollständig eliminiert.

Pflanzen. In einigen Zellen ließen sich weitere, größere Strukturen nachweisen (Bild 37 Aufnahme 5), welche offensichtlich mit Chloroplasten assoziiert waren (Bild 37 Aufnahme 6). Auch von dieser Pflanze (Linie UH39) wurde eine Immuno-Gold-Markierung von M. Melzer durchgeführt. Die Goldpartikel lagen zum Teil in den Plasmodesmata (Bild 38). Zu anderen Markierungen, z. B. zu Mitochondrienmarkierungen konnte keine gesicherte Aussage gemacht werden. Melzer erklärte, daß die Markierung der Plasmodesmata seltener - d. h. schwerer - zu finden war als im Vergleich zu der untersuchten 19,5k:gfp-Gen-transgenen Pflanze (UH13).



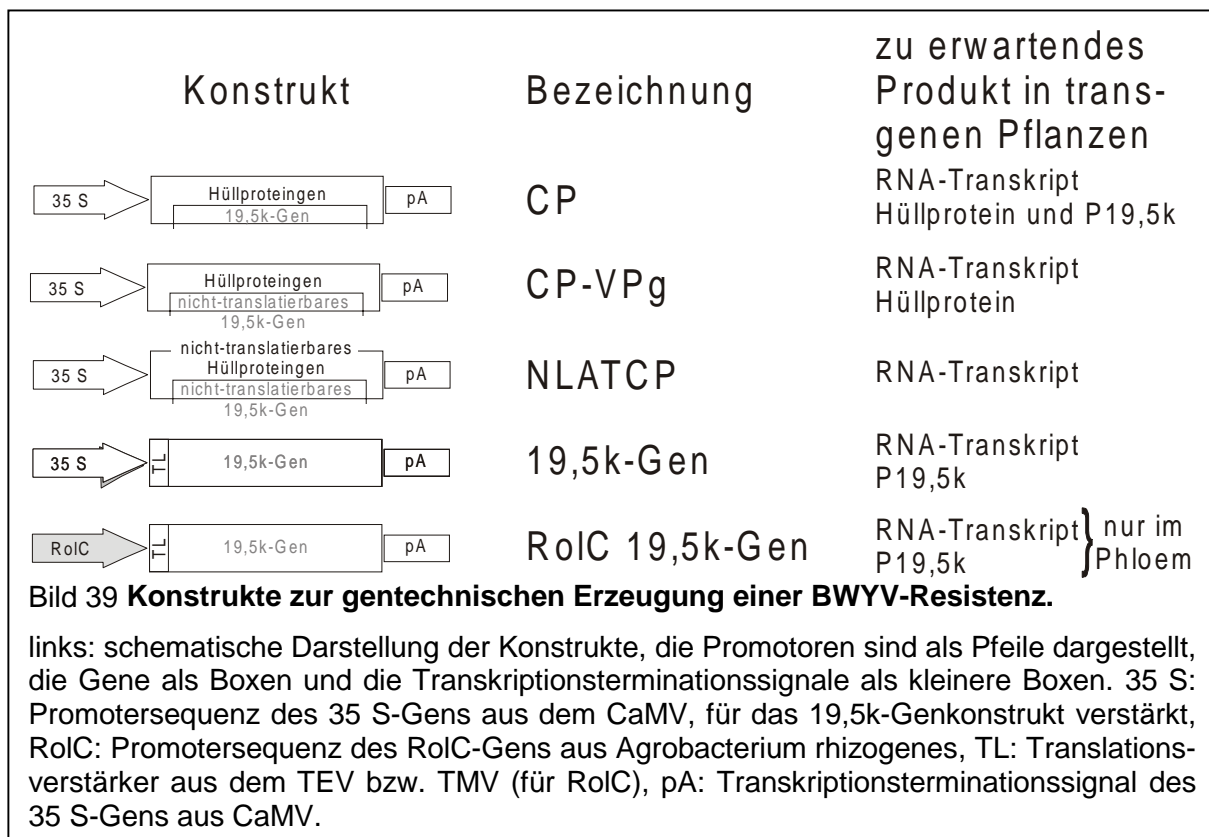
**Bild 38 Immuno-Gold-Markierung einer 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgenen *N. glauca*-Pflanze (UH 39).**

Die Schnitte der Mesophyllzellen wurden mit einem GFP-Antikörper markiert. In den Aufnahmen sind Gold-Markierungen im Bereich der Zellwände zu sehen. Die grauen Strukturen innerhalb der Zellwände, in denen die Markierungen liegen, sind Plasmodesmata (Aufnahme 1 und 2). In 1: markiert der Pfeil 0,25 μm; in 2: 0,43 μm; in 3: 0,4 μm, die kleinen Pfeile weisen auf die Markierung eines Mitochondriums hin.

## 7 Diskussion

### 7.1 Nachweis und Expression der Hüllprotein- und 19,5k-Genkonstrukte in transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen

In der vorliegenden Arbeit sollten u. a. Grundlagen zur gentechnischen Erzeugung einer Resistenz gegen das Westliche Rübenvergilbungsvirus (beet western yellows virus; BWYV) erarbeitet werden. Basierend auf den in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten (siehe Einleitung) wurden verschiedene Genkonstrukte entwickelt (Bild 39). Ausgeklammert wurden Konstrukte mit Sequenzen des Replikationsapparates.



*N. benthamiana*-Pflanzen wurden mit Hüllprotein- und Transportprotein (19,5k)-Genkonstrukten transformiert. Die entsprechenden Sequenzen wurden aus einem BWYV-Hüllprotein-Gen-cDNA-Klon isoliert und zwischen die Regulationssequenzen (35S-Promoter und Terminator) des Blumenkohl-Mosaikvirus (CaMV) 35S-Gens kloniert. Der CaMV 35S-Promoter garantiert eine hohe konstitutive Expression in fast allen Organen der transgenen Pflanze. Das 19,5k-Gen wurde zusätzlich unter die Kontrolle des RolC-Promoters gesetzt. Der RolC-Promoter ist eine Regulationssequenz aus dem *Agrobacterium rhizogenes* und bewirkt eine Phloem-spezifische Expression der regulierten Gene.

Die Überprüfung der Integration und Expression des Hüllproteingens sowie des 19,5k-Gens in den transgenen Pflanzen wurde auf Nukleinsäure-Ebene mit Hilfe der Southern- und Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Durch die Verwendung von Pflanzenmaterial aus der Selbstungsnachkommenschaft sollte ausgeschlossen sein, daß *Agrobacterien* in den Pflanzen persistierten und somit nur *Agrobacterien*-Vektorsequenzen nachgewiesen wurden. Die Überprüfung der Integration des nptII-Gens in transgenen Pflanzen wurde mit Hilfe der PCR durchgeführt. Diese Methode ist sehr empfindlich und erlaubt den Nachweis weniger Genkopien. Die PCR ist wesentlich sensitiver als die Southern-Blot-Analyse.

Da das nptII-Gen und das virale Genkonstrukt auf einer T-DNA lagen, sollten nptII-Gen-positive Pflanzen ebenfalls das virale Gen enthalten. In der Southern-Blot-Analyse mit einer entsprechenden viralen Sonde ließ sich dieses nicht bestätigen. In einigen Pflanzenlinien, welche nach PCR als nptII-positiv bestimmt worden waren, ließen sich die viralen, transgenen Sequenzen nicht nachweisen. Dies kann zum einen die Ursache haben, daß die T-DNA nicht vollständig übertragen worden war, oder zum anderen die Southern-Blot-Analyse dort nicht sensitiv genug war, das virale Transgen zu detektieren (Bild 10 z. B. Linie 286 und 302). In einigen Linien wurden größere Fragmente als erwartet nachgewiesen (z. B. in Linie 81, Bild 10 A). Dieses läßt sich durch anomale T-DNA-Insertionen erklären. Möglicherweise hat eine Mutation während des Einbaus des Konstruktes in das Pflanzengenom stattgefunden. Da aber das Hüllprotein-mRNA-Transkript von erwarteter Größe war (Linie 81, Bild 11 A), läßt sich vermuten, daß das Mutationsereignis Hüllproteingen-flankierende Bereiche betraf (ähnliches beschrieben van der Wilk et al., 1991).

Im Genom der Linie 17 (CP) konnte die cp-Gen-DNA-Sequenz durch die Southern-Blot-Analyse nicht nachgewiesen werden (Bild 10 A), wohingegen in der Northern-Blot-Analyse (Bild 11 A) die Expression des Transgens belegt werden konnte. In der Linie 150 (RoIC 19,5k) wurde in der Western-Blot-Analyse die Bildung des P19,5k nachgewiesen (Bild 22 B). Die Bildung der spezifischen mRNA konnte in dieser Linie nicht belegt werden (Bild 17 B). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß in einigen Fällen möglicherweise die nicht-radioaktive Detektion sowohl in der Southern-, als auch in der Northern-Blot-Analyse nicht sensitiv genug war, um die entsprechenden Gene oder mRNA nachzuweisen.

Die Bildung der Transgen-mRNA konnte für jedes Konstrukt in mindestens zwei transgenen Pflanzen gezeigt werden. Die Funktionalität der hergestellten Konstrukte auf mRNA-Ebene ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einer gentechnisch erzeugten BWYV-Resistenz in transgenen Rapspflanzen, da die beschriebenen Luteovirusresistenzen vermutlich RNA-vermittelt sind (siehe 4.2.4).

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen werden in der Tabelle 7 (Hüllproteingen-Konstrukte) und in der Tabelle 8 (19,5k-Gen-Konstrukte) zusammengefaßt.

In allen untersuchten Hüllproteingen-transgenen Pflanzen konnte die Bildung des Hüllproteins durch das sensitive ELISA-Verfahren nicht nachgewiesen werden. Das Vorhandensein des Proteins kann nicht ausgeschlossen werden, es liegt möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze. Van der Wilk et al. (1991), Barker et al. (1993) und Tacke (persönliche Mitteilung) berichteten von der gleichen Schwierigkeit, in ihren PLRV-Hüllproteingen-transgenen Pflanzen das Hüllprotein durch ELISA oder andere Verfahren nachzuweisen. Tacke postulierte eine starke Instabilität des Hüllproteins in transgenen Pflanzen, welches ohne das Zusammenspiel mit den anderen Virusproteinen sofort nach Bildung abgebaut wird (persönliche Mitteilung). Das P19,5 wurde in den Hüllproteingen-transgenen Pflanzen durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen. In den untersuchten NLATCP und CP-VPg-transgenen Pflanzen konnte jedoch das P19,5k nicht detektiert werden (Bild 12). Die Zerstörung des 19,5k-Gen-Startkodons und die Einführung der Stopkodone waren offensichtlich wirksam, um eine Bildung des P19,5k in den transgenen Pflanzen zu verhindern. Diese Zerstörung erhöht mutmaßlich nicht die Bildung des Hüllproteins in den untersuchten CP-VPg-transgenen Linien. Van der Wilk (1995) berichtete, daß durch die Deletion des PLRV-17k-Gen-Startkodons innerhalb eines Hüllproteingen-Konstruktes keine Erhöhung der Hüllproteinkonzentration in entsprechenden transgenen Kartoffeln zu erreichen war.

In den 19,5k-Gen-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen ließ sich die Bildung der spezifischen mRNA belegen (Bild 17). In der Western-Blot-Analyse konnte die Bildung des P19,5k für das 35S- sowie für das RoIC-Promoterkonstrukt nachgewiesen werden (Bild 22).

## 7.2 BWYV-Resistenztest in *N. benthamiana*

Als Modellsystem für eine gentechnisch erzeugte BWYVirusresistenz in Raps wurde *N. benthamiana* ausgewählt. *N. benthamiana* gehört zu den Wirtspflanzen des BWYV und läßt sich effizient durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer transformieren. Die BWYV-

Infektion äußerte sich in dieser Pflanze u. a. durch eine starke Wachstumsdepression (Bild 23). Die Resistenztests mit transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen nach BWYV-Infektion führten zu dem Ergebnis, daß die Hüllprotein-ELISA-Werte sowohl innerhalb einer Pflanze als auch zwischen den Pflanzen stark schwankten. Diese Schwankungen führten dazu, daß die erhaltenen Daten für die Versuche nicht statistisch ausgewertet werden konnten, da der Stichprobenumfang war zu klein gewählt worden. Im Ergebnisteil wurden dennoch die erhobenen Daten für einige RoIC 19,5k-Gen-transgene Linien dargestellt. Erst in dem später durchgeführten Resistenztest mit den homozygoten Samen einiger RoIC 19,5k-Gen-transgener *N. benthamiana*-Linien wurde die Anzahl der Pflanzen pro Linien und Kontrollen auf ca. 20 erhöht. Einzig die Linie 150 zeigte sowohl für die F1 als auch für die F2-Nachkommenschaft in mehreren Tests niedrigere Werte als die Kontrollpflanzen sechs Wochen nach Inokulation mit dem Virus. Die Linie 150 zeigte in der Northern-Blot-Analyse (Bild 17) keine Bildung der spezifischen mRNA des Transgens, dennoch konnte in der Western-Blot-Analyse (Bild 22) das P19,5k nachgewiesen werden. Eine RNA-vermittelte Resistenz hätte nur dann vorgelegen, wenn das Protein nicht nachweisbar gewesen wäre. Durch eine Induktion des post-transcriptional gene silencing bezogen auf das 19,5k-Gen in dieser Linie 150 könnte das homologe Virusgen ebenfalls in diesen Inaktivierungsmechanismus einbezogen werden und so eine Resistenz gegen das Virus aufgebaut werden. Eine aktuelle Übersicht mit besonderem Bezug auf Virusresistenz gibt der Artikel von Waterhouse et al. (1999). Ein recovery-Phänotyp konnte durch den visuellen Vergleich der infizierten, transgenen Pflanzen der Linie 150 mit der nicht-infizierten Kontrolle nicht vermutet werden. Ob tatsächlich eine Virusresistenz vorliegt, muß durch Einbeziehung von z. B. Ertragsparametern in die Resistenztests geklärt werden. Die alleinige Verwendung von ELISA-Werten zur Beurteilung einer Luteovirusresistenz erscheint wegen der starken Streuung zumindest bei *N. benthamiana* sehr unsicher.

Huth (Biologische Bundesanstalt f. Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig) zählt für seine Toleranzbestimmung - er spricht nicht von Resistenzbestimmung - BYDV-toleranter Gräser bzw. Getreidepflanzen zahlreiche Anforderung auf. Neben der Homogenität des Sortenmaterials sowie eines möglichst 100%igem Infektionserfolgs sei der Aufwuchs der Pflanzen unter natürlichen Umweltverhältnissen nötig. Huth erhebt die Relativerträge zur Basis der Toleranzbeurteilung. Der Ernteertrag - bei Getreide der Kornertrag - sollte die Grundlage zur Beurteilung der Toleranzeigenschaften von Pflanzen bilden. Er vergleicht die Erträge der nicht-infizierten Kontrollen einer Sorte mit den infizierten Pflanzen derselben Sorte. Die Halmlängen und die Zahl der Ähren korrelierten nur in Annäherung mit dem Ernteertrag und dienen deshalb nur zur visuellen Vorselektion toleranter Pflanzen.

Eine umfassendere Untersuchung der transgenen Pflanzen – wünschenswerter Weise nach dem Konzept von Herrn W. Huth – konnte während des Untersuchungszeitraums aus Kapazitätsgründen im Gewächshaus nicht durchgeführt werden.

Aktuelle BWYV-Resistenztests von z. B. ORF1/2-transgenen *N. benthamiana*-Pflanzen (Valenzuela, unveröffentlichte Arbeiten) mit einer größeren Zahl an getesteten Pflanzen pro Linie (vergrößerter Stichprobenumfang) erbrachten trotz der Einbeziehung der relativen Wuchshöhe neben den ELISA-Werten keine klaren Ergebnisse. Zwischen einzelnen unabhängigen Versuchansätzen gab es z. T. widersprüchliche Ergebnisse zur Resistenz der untersuchten Linien. Es erscheint schwierig, die Versuchsparameter, wie z. B. die Umweltbedingungen in allen Versuchen konstant zu halten.

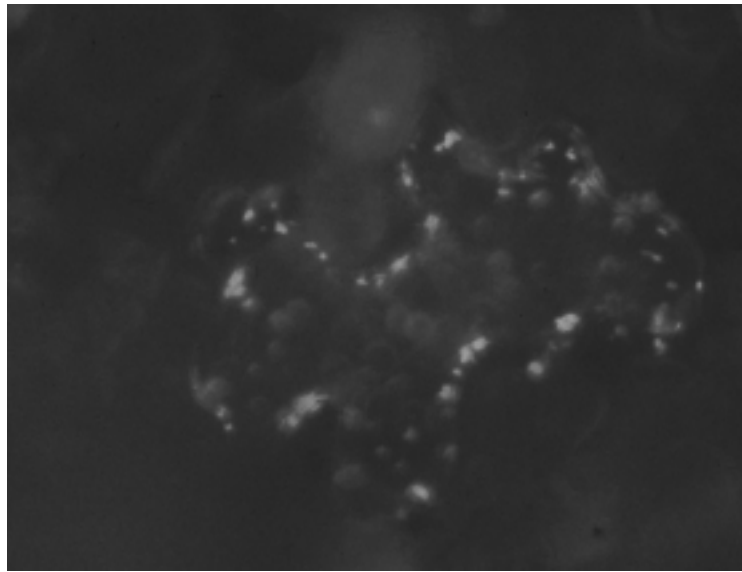
### **7.3 Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung des GFP nach Fusion mit dem P19,5k**

Die Zielsetzung dieses Teils der Arbeit war die Lokalisierung des GFP in transformierten Tabakzellen oder -pflanzen nach Fusion mit dem P19,5k des BWYV sowie die Bestimmung funktionsrelevanter Peptidomänen.

Die Fluoreszenz- und die konfokale Laserscanningmikroskopie von *N. benthamiana* Blättern nach Partikelbombardement mit pCK 19,5k:GFP zeigte eine punkartige Fluoreszenz in der Nähe der Zellwand von Epidermiszellen (Bild 27). In den Kontrollexperimenten mit pCK GFP

S65C und pCK  $\Delta$ 19,5k:GFP - welche ein nicht-fusioniertes GFP bzw. eine GFP-Fusion mit einer Deletionsmutante des P19,5k produzierten - konnte keine spezifische Lokalisierung der Fluoreszenz in Epidermiszellen detektiert werden (Bild 28 Aufnahme 9 bzw. Bild 29 B). Diese Zellen zeigten die typische diffuse Verteilung des freien GFP in Pflanzenzellen (Reichel et al., 1996). Die Lokalisierung des chimären Fusionsproteins in den Epidermiszellen entspricht der des GFP, fusioniert mit dem TMV 30k Transportprotein (P30k:GFP) (eigene Daten und Solovyev, unveröffentlicht, Bild 40). Pagett et al. (1996) und Oparka et al. (1997) beschrieben eine sehr ähnliche Verteilung des P30k:GFP in Pflanzenzellen. Zahlreiche Befunde bestätigten die Annahme, daß das P30k an Plasmodesmata (PD) bindet (Deom et al., 1990; Ding et al., 1992; Oparka et al., 1997). Diese Homologie im Fluoreszenzphänotyp zwischen dem P19,5k:GFP und dem P30k:GFP läßt vermuten, daß auch das chimäre BWYV-Transportprotein-GFP-Konstrukt in den PD lokalisiert wird.

Nach Elektroporation von *N. tabacum* Protoplasten mit dem Plasmid pCK 19,5k:GFP wurde



**Bild 40 Aufnahme einer TMV 30k:gfp-Gen-transformierten Tabak-Epidermiszelle nach Partikelbombardement.**

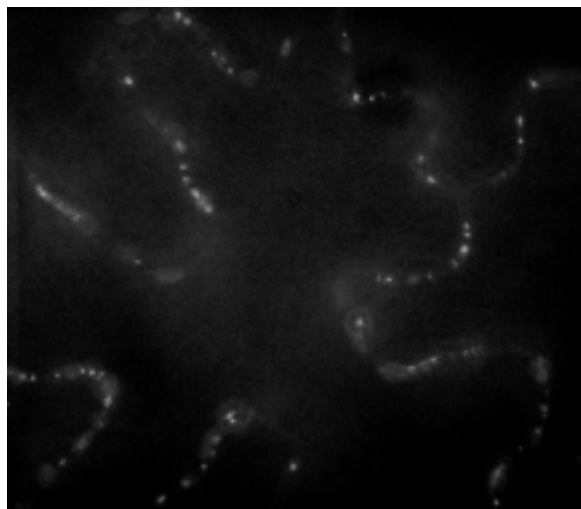
Die Aufnahme entstand mit einem Fluoreszenzmikroskop ca. 24 h nach Beschuß. Die Zelle besitzt eine Größe von ca. 50  $\mu$ m. Das Plasmid mit der TMV 30k:gfp-Gen-Expressionskassette wurde mir von A. Solovyev (Universität Moskau) zur Verfügung gestellt.

ebenfalls 16 - 48 Stunden nach Transfektion eine Akkumulation in distinkten, fluoreszierenden Punkten auf oder in der Nähe der Zelloberfläche beobachtet (Bild 26 und 27). Ganz im Unterschied zu den Ergebnissen mit den Kontrollplasmiden pCK  $\Delta$ 19,5k:GFP und pCK GFP S65 C, welche eine diffuse Fluoreszenz innerhalb der Protoplasten zeigten (Bild 29 A bzw. Bild 31 links oben). Unklar bleibt, ob sich das chimäre Fusionsprotein P19,5k:GFP in PDs oder in PD-Vorläuferstrukturen lokalisiert. PD-Vorläuferstrukturen beginnen sich sofort nach Beendigung der Enzymeinwirkung herauszubilden (R. Kollmann, persönliche Mitteilung; Monzer, 1991; Ehlers und Kollmann, 1996). Zusätzlich zu der gleichen punkartigen Verteilung des P30k:GFP wurden fluoreszierende, filamentöse Strukturen von Heinlein et al. (1995) und McLean et al. (1995) beschrieben. Dieses Phänomen konnte in den pCK 19,5k:GFP-transfizierten Protoplasten nicht beobachtet werden. Unklar ist, ob diese fluoreszierenden Strukturen aufgrund einer mutmaßlich geringeren Expression des chimären Fusionsproteins P19,5k:GFP nicht vorliegen und deshalb nicht dokumentiert werden konnten oder tatsächlich nicht vorhanden waren.

Die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung in einer Western-Blot-Analyse bestätigen deutlich die Hypothese der Zellwandbindung des P19,5k. So konnte gezeigt werden, daß das chimäre Fusionsprotein fast ausschließlich in der Zellwandfraktion und in der Membranfraktion vorkommt (Bild 35). Das Ergebnis stimmt mit der Lokalisierung des PLRV

P17k in infizierten Kartoffeln überein (Tacke et al., 1993). M. Melzer im IPK Gatersleben führte mit Hilfe der Immuno-Gold-Markierung eine Untersuchung über die Lokalisierung des P19,5:GFP in einer transgenen Tabakpflanze (UH 13) durch (Bild 34). Die Gold-Markierung bestätigte die PD-Lokalisierung des Transportproteins. Schmitz et al. (1997) untersuchten PLRV 17k-Gen-transgene Pflanzen ebenfalls mit Hilfe der Immuno-Gold-Markierung. Sie lokalisierten das P17k ausschließlich in den PDs der Pflanzenzellen. Die vorher genannten Ergebnisse stimmen mit fluoreszenzmikroskopischen Daten der 19,5k:gfp-Gen-transgenen Tabakpflanzen (Bild 32), in denen distinkte, punktförmige Lokalisierungen des Fusionsproteins vermutlich innerhalb der Zellwände zu entdecken waren, überein. Die fluoreszierenden Strukturen sind auf die Bereiche beschränkt, die zytoplasmatische Verbindungen zu benachbarten Zellen aufweisen (Bild 32, Aufnahme 3). Hofius (1998) fusionierte das PLRV 17k-Gen ebenfalls mit dem gfp-Gen. In den 17k:gfp-Gen-transgenen Tabakpflanzen konnte die gleiche Zellwandlokalisierung des fusionierten GFP bestimmt werden (Bild 41).

In TMV 30k-Gen-transgenen Pflanzen konnte das Transportprotein mit der Immuno-Gold-



**Bild 41 Aufnahme aus einer 17k:gfp-Gen-transgenen *N. tabacum*-Pflanze.**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Epidermiszelle von ca. 100 µm Durchmesser. Die 17k:gfp-Gen-transgene Pflanze wurde mir von D. Hofius (IPK Gatersleben) zur Verfügung gestellt.

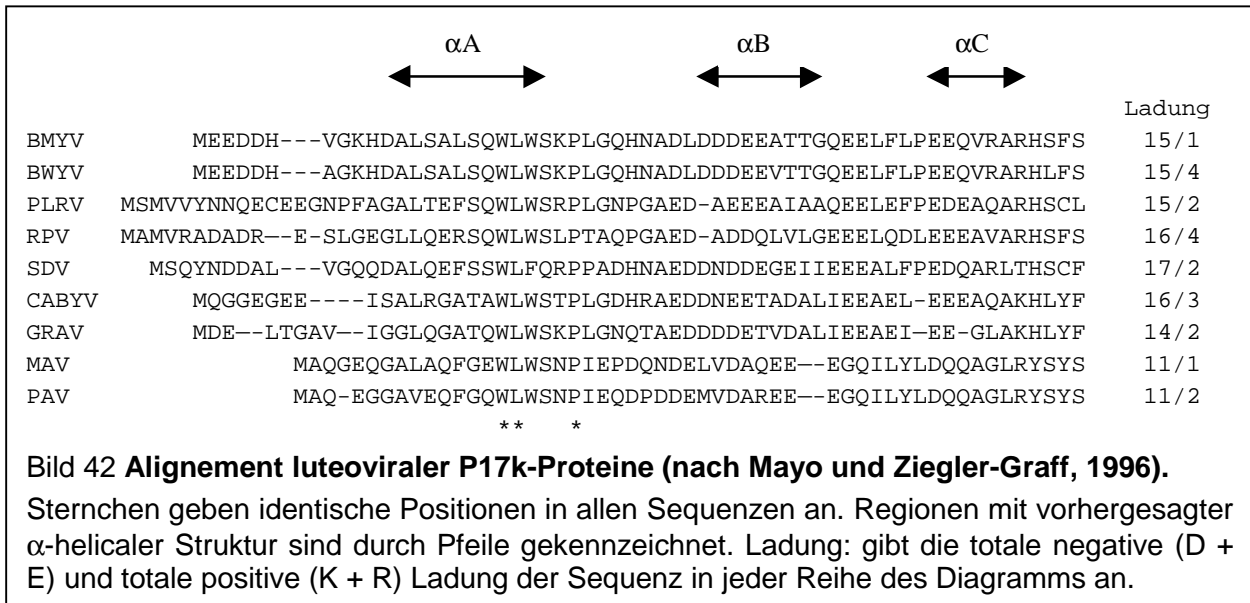
Technik ebenfalls in PDs lokalisiert werden (Atkins et al., 1991; Ding et al., 1992; Moore et al., 1992). Zusätzlich konnte das P30k:GFP – exprimiert über rekombinante Virusvoll-längenklone – in Punkten innerhalb der Zellwand durch Fluoreszenz des Fusionsproteins und mit konfokaler Laserscanningmikroskopie lokalisiert werden (Oparka et al., 1996; Padgett et al., 1996). Jüngste Daten zeigten, daß das P30k:GFP in TMV-infizierten Epidermiszellen mit PD-assoziiierter Kallose co-lokalisiert (Oparka et al., 1997). Eine Anfärbung nicht-transgener und 19,5:gfp-Gen-transgener Pflanzen mit Sirofluor, welches spezifisch an Kallose bindet (also indirekt PDs), zeigte im Fluoreszenzmikroskop die gleiche punktartige Fluoreszenz innerhalb der Zellwände (Daten werden nicht gezeigt) wie das chimäre Fusionsprotein P19,5k:GFP. Einen weiteren Beweis der PD-Lokalisierung des BWYV Transportproteins liefert die Regeneration von Protoplasten aus einer 19,5k:gfp-Gen-transgenen Pflanze (UH13). In den isolierten Protoplasten aus Blättern, welche die punktartige Fluoreszenz zeigten, war keine Fluoreszenz mehr zu entdecken (Bild 33 Aufnahme 2). Protoplasten aus einer gfp-Gen-transgenen Pflanze (AL36) fluoreszierten auch nach ihrer Isolierung diffus im Innern der Zelle (Bild 33, Aufnahme 1). Nach einer Woche konnten im Zellwandbereich sich berührender Tochterzellen aus 19,5:gfp-Gen-transgenen Protoplasten die punktartigen, fluoreszierenden Strukturen beobachtet werden (Bild 33, Aufnahmen 3 – 6).

Nachdem die Lokalisierung des P19,5k in den PD durch zahlreiche molekularbiologische Methoden belegt werden konnte, war es von Interesse, Sequenzmotive innerhalb des Proteins zu ermitteln, durch die eine Lokalisierung bestimmt wird. Ein Vergleich der P17k-Aminosäuresequenz einiger Luteoviren zeigt konservierte Aminosäuren und nach rechnergestützten Strukturvorhersagen auch einige homologe Strukturdomänen (Tacke et al., 1993; Mayo und Ziegler-Graff, 1996). Es wurden zwei Domänen im N-Terminus ausgewählt, zum einen das SQWL-Motiv und zum anderen das nachfolgende DDDEE-Motiv. Die Mutation des SQWL-Motivs führte zu keiner Veränderung in der Lokalisierung des chimären Fusionsproteins. Die Ergebnisse aus der transienten und der stabilen Expression des 19,5k SQWL:gfp-Genkonstruktes in Pflanzen entsprachen denen der 19,5k:gfp-Genexpression (Daten werden nicht gezeigt). Diese Domäne scheint folglich nicht mit der spezifischen Lokalisierung des P19,5k in Beziehung zu stehen.

Anders veränderte die Mutation des DDDEE-Motivs die Lokalisierung des P19,5k innerhalb der Zelle. Nach transienter Expression des pCK 19,5k DDDEE:GFP in Tabak-Protoplasten (Elektroporation) und Epidermiszellen (Partikelbombardement) zeigte sich eine Fluoreszenz innerhalb der Zelle (Bild 31, Aufnahme links unten bzw. Bild 30). In der Western-Blot-Analyse nach subzellulärer Fraktionierung aus einer 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgenen Pflanze wurde das Fusionsprotein ausschließlich in der löslichen Fraktion nachgewiesen (Harr, 1998). Die Immuno-Gold-Markierung – von M. Melzer durchgeführt – wies in dieser Pflanze das P19,5k DDDEE:GFP in PD nach. In einem Fall gelang es Melzer, eine Mitochondrien-Markierung mit Goldpartikeln zu dokumentieren (Bild 38). Melzer erklärte, daß es – im Gegensatz zu den Untersuchungen der 19,5k:gfp-Gen-transgenen Pflanze – schwierig war, spezifische Markierungen zu finden.

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgener Tabakpflanzen widersprechen einer Zellwandlokalisierung des mutierten Fusionsproteins. Vielmehr wurde das chimäre Protein innerhalb der Zelle entdeckt. In einigen Zellen konnten kleinere, subzelluläre Akkumulationen beschrieben werden (Bild 36, z. B. Aufnahme 2). In den Untersuchungen von Hedtke et al., (1999) zur subzellulären Lokalisierung von Proteinsequenzen nach Fusion mit dem GFP (z. B. in Mitochondrien) wurden ähnliche Strukturen beschrieben, wie sie in den 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgenen Tabakpflanzen (UH39 und UH66) festgestellt worden waren. B. Hedtke und A. Weihe (Institut für Genetik, Humboldt-Universität Berlin) bestätigten, zu der Frage der potentiellen Mitochondrienlokalisierung des P19,5k DDDEE:GFP in transgenen Tabakpflanzen, eine starke Ähnlichkeit mit ihren Ergebnissen. Nach Begutachtung 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgener Pflanzen (UH39 und UH66) im Fluoreszenzmikroskop erklärten sie, daß die zahlreichen, z. T. stäbchenartigen, fluoreszierenden Strukturen in Größe, Form und Anordnung Mitochondrien entsprächen (wie in Bild 36, Aufnahme 6 und 8). In Epidermiszellen von Wurzeln konnten vereinzelt größere fluoreszierende Strukturen detektiert werden, welches sie mit Leukoplasten in Beziehung brachten (Daten werden nicht gezeigt). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Protoplasten aus einer 19,5k DDDEE:gfp-Gen-transgenen Pflanze (Bild 37, Aufnahmen 1 - 3) ergab zusätzlich, daß – anders als bei den 19,5k:gfp-Gen-transgenen Protoplasten – die fluoreszierenden Strukturen nach Zellwandabbau in der Zelle erhalten blieben.





In den Mikrokalli waren innerhalb der Zellen ähnliche fluoreszierende Strukturen sichtbar wie in den Epidermiszellen der Blätter (Bild 37, Aufnahmen 4 - 6). Bis auf die Immuno-Gold-Markierung entsprachen die Ergebnisse der Hypothese, daß mit der Mutation des DDDEE-Motivs – einer mutmaßlichen amphipathischen  $\alpha$ -Helix – die subzelluläre Lokalisierung des P19,5k in die PD verhindert oder zumindest stark beschränkt wird. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Auflösungsvermögen im Fluoreszenzmikroskop stark von der Intensität des Signals abhängt. Vermutlich akkumulieren in der Mutante zu wenige GFP-Moleküle – fusioniert mit dem 19,5k DDDEE – innerhalb der PD, um sie detektieren zu können. Heinlein (persönliche Mitteilung, 1999) berichtete, daß bei der Immuno-Gold-Markierung zur Lokalisierung des TMV P30k in Pflanzen ist nie etwas anderes gefunden worden sei als die Lokalisierung in PD, obwohl viel größere Mengen des Proteins ganz woanders sein. Zudem ergäbe sich das Problem der Strukturhaltung durch die Fixierungsmethode. Die Zellwand sei stabil und damit auch die PDs. Ein Protein hier nachzuweisen sei dann vergleichsweise leicht.

Die biochemischen Analysen des PLRV P17k deckten zwei funktionelle Domänen auf: eine single stranded Nukleinsäure-Bindungsdomäne und eine Dimerisierungsdomäne, bestehend aus einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix im sauren N-Terminus (Tacke et al., 1993). Schmitz et al. (1997) vermuteten, daß diese amphipathische  $\alpha$ -Helix dafür verantwortlich ist, daß das P17k in den Membranfraktionen infizierter Pflanzen nachzuweisen ist. Es ist die gleiche Domäne, die hier in dieser Arbeit als PD-Lokalisierungsdomäne charakterisiert wurde.

Berna (1995) beschrieb den Einfluß zusammenliegender, negativ geladener Aminosäuren auf die Zellwand-Lokalisierung der Transportproteine der Viren TMV und AMV (Luzerne Mosaikvirus). Auch hier beeinflussen C-terminale, amphipathische  $\alpha$ -Helices mit zwei Gruppen negativ geladener Aminosäuren, EE und DE, die spezifische Lokalisierung. Die Änderung des DE-Motivs – im Falle des TMV P30k – zu AA reduzierte die Zellwand-lokalisierung des Proteins um das 11fache. Dabei betont Berna, daß vermutlich die Ladungseigenschaften eine größere Rolle spielen als die Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix), da Gruppen geladener Aminosäuren häufig an der Oberfläche der Proteine vorkommen und an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein können. Berna's Schlußfolgerung war, daß die  $\alpha$ -Helices des TMV MP und des AMV MP wahrscheinlich mit Membranen oder zellulären Proteinen interagieren und so die Translokation oder Fixierung des Transportproteins verstärken oder erst ermöglichen. Anders als beim PLRV P17k, bei dem diese Interaktion über den hydrophoben Teil der Helix vermutlich stattfindet (Tacke et al., 1993), sind in diesen beiden MPs die sauren Aminosäuren an der Bindung mit den zellulären Proteinen beteiligt. Offensichtlich findet nach den vorliegenden Ergebnissen die Proteininteraktion zur Translokation in die Zellwand im Falle der luteoviralen Transportproteine auch über den negativ geladenen Teil der  $\alpha$ -Helix statt. Im Gegensatz zu der  $\alpha$ -Helix des P30k liegt bei den beiden luteoviralen Helices

keine klare Ladungstrennung vor, und sie liegen zudem im N-Terminus des Transportproteins. Kahn et al. (1998) postulierten, daß eher Strukturen funktioneller Domänen als spezifische Aminosäuren innerhalb dieser Domänen wichtig für die Funktion des Proteins sind. Die Arbeiten von Berna (1995), vorliegende Arbeit und die Ergebnisse von Harr (1998) sprechen dafür, daß - zumindest für diese Domäne - die negativ geladenen Aminosäuren (D und E) für die Funktion verantwortlich sind. Diese Domäne kann nicht allein für die vermutete PD-Lokalisierung verantwortlich sein, da auch das P $\Delta$ 19,5k:GFP-Fusionsprotein nicht mehr in den PD nachgewiesen werden konnte (Bild 29). Vermutlich sind die Tertiärstruktur oder weitere Motive im C-Terminus des P19,5k für die PD-Lokalisierung erforderlich.

Die Bedeutung der Lokalisierung in/an Mitochondrien und zum Teil Plastiden bleibt ungeklärt. A priori würde man das P19,5k DDDEE eher im Zytoplasma erwarten. Möglicherweise verstärkt die Mutation die Membran-bindende Eigenschaft des Proteins. Schmitz et al. (1997) belegten eine Bindung des PLRV P17k an Mitochondrien und Chloroplasten nach Expression durch einen PLRV-Volllängenklon oder nach Virusinfektion.

Die im letzten Abschnitt diskutierten Ergebnisse zur Lokalisierung des P19,5k sind für die praktische Anwendung nützlich. Das Wissen über die Lebensweise eines Virus – dazu gehört z. B. auch die Funktion seiner Transportproteine – läßt Strategien zur Bekämpfung des Virus entwickeln. Somit schließt sich der Kreis zum ersten Abschnitt dieser Arbeit, nämlich der Herstellung von geeigneten Virusgen-abgeleiteten Genkonstrukten zur Erzeugung einer BWYV-Resistenz in Raps. Die Ergebnisse könnten auch auf andere Luteoviren oder andere Virusgruppen angewandt werden, da sich die verschiedenen Transportproteine wahrscheinlich ähnliche bzw. gleiche Mechanismen zur Zell-zu-Zell-Ausbreitung zunutze machen.

## 8 Literatur

- Amann, E., Brosius, J., and Ptashne, M. 1983.** Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 25:167-178
- Anderson, J. M., Palukaitis, P., and Zaitlin, M. 1992.** A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 89:8759-8763
- Anon. 1989.** Product catalog Promega corp. Madison
- Anon. 1990.** Product catalog Stratagene. Palo Alto
- Atkins, D., Hull, R., Wells, B., Roberts, K., Moore, P., and Beachy, R. N. 1991.** The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* 72:209-211.
- Audy, P., Palukaitis, P., Slack, S. A., and Zaitlin, M. 1994.** Replicase-mediated resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 7:15-22
- Barker, H., Reavy, B., Webster, K. D., Jolly, C. A., Kumar, A., and Mayo, M. A. 1993.** Relationship between transcript production and virus resistance in transgenic tobacco expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Plant Cell Reports* 13:54-58
- Barker, H., Solomon-Blackburn, R. M., McNicol, J. W., and Bradshaw, J. E. 1994a.** Resistance to potato leafroll virus multiplication in potato is under major gene control. *Theoretical and Applied Genetics* 88:754-758
- Barker, H., Webster, K. D., Jolly, C. A., Reavy, B., Kumar, A., and Mayo, M. A. 1994b.** Enhancement of resistance to potato leafroll virus multiplication in potato by combining the effects of host gene and transgene. *MPMI* 7:528-530
- BASF. 1996.** Raps-Kultur mit Perspektive.
- Baulcombe, D. C. 1996.** RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol. Biology* 32:79-88
- Baulcombe, D. C., and English, J. J. 1996.** Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 7:173-180
- Bazan, J. F., and Fletterick, R. J. 1989.** Comparative analysis of viral cysteine protease structural models. *FEBS Lett.* 249:5-7
- Beachy, R. N. 1993.** Virus resistance through expression of coat protein genes. *Biotechnology in Plant Disease Control* 89-104
- Berna, A. 1995.** Involvement of residues within putative  $\alpha$  helix Motifs in the behavior of the alfalfa and tobacco mosaic virus movement proteins. *Phytopathology* 85:1441-1448
- Birnboim, H. C., and Doly, J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *DNA* 4:165-170
- Braun, C. J., and Hemenway, C. L. 1992.** Expression of amino-terminal portions or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection. *The Plant Cell* 4 (6):735-744.
- Brederode, F. T., Taschner, P. E. M., Posthumus, E., and Bol, J. F. 1995.** Replicase-mediated resistance to alfalfa mosaic virus. *Virology* 207:467-474
- Brent, R., and Ptashne, M. 1981.** Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Nat. Acad. Sci* 78:4204-4208
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., and Short, J. M. 1987.** *Biotechniques* 5:376
- Carr, J. P., and Zaitlin, M. 1991.** Resistance in transgenic tobacco plants expressing a nonstructural gene sequence of tobacco mosaic virus is a consequence of markedly reduced virus replication. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 4:579-585.
- Casper, R. 1988.** Luteoviruses. *The Plant Viruses* 3:235-258
- Caumont, C., Petitprez, M., Woynaroski, S., Barthou, H., Briere, Chr., Kallerhoff, J., Borin, Chr., Souvré, A., and Alibert, G. 1997.** Agarose embedding affects cell wall regeneration and microtubule organization in sunflower hypocotyl protoplasts. *Phys. Plantarum.* 99:129-134
- Chay, C. A., Gunasinge, U. B., Dinesh-Kumar, S. P., Miller, W. A., and Gray, S. M. 1996.** Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf

- luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and the 17-kDa protein, respectively. *Virology* 219:57-65
- Citovsky, V., and Zambryski, P. 1991.** How do plant viruses move through intercellular connections?. *BioEssays* 13:373-379
- Citovsky, V., and Zambryski, P. 1993.** Transport of nucleic acids through membrane channels: Snaking through small holes. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:167-197
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J. A., Dodds, J. A., and Beachy, R. N. 1995.** A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* 206(1):307-313
- Culver, J. N., and Dawson, W. O. 1991.** Tobacco mosaic virus elicitor coat protein genes produce a hypersensitive phenotype in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 5:458-463
- Culver, J. N., Plonk, K., and Stubbs, G. 1995.** Site-directed mutagenesis confirms the involvement of carboxylate groups in the disassembly of tobacco mosaic virus. *Virology* 206 (1):724-730
- Cunningham, B. C., and Wells, J. A. 1989.** High resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* 244:1081-1085
- Cuozzo, M., O'Connell, K. M., Kaniewski, W., Fang, R. -X., Chua, N.-H., and Tumer, N. E. 1988.** Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6:549-557
- Deom, C.M., Schubert, K.R., Wolf, S., Holt, C.A., Lucas, W.J., and Beachy, R.N. 1990.** Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:3284-3288
- Derrick, P. M., and Barker, H. 1997.** Short and long distance spread of potato leafroll luteovirus: effects of host genes and transgenes conferring resistance to virus accumulation in potato. *Journal of Gen. Virol.* 78:243-251
- Dinesh-Kumar, S. P., and Miller, W. A. 1993.** Control of start codon choice on a plant viral RNA encoding overlapping genes. *The Plant Cell* 5:679-692
- Ding, B., Haudenschild, J. S., Hull, R. J., Wolf, S., Beachy, R. N., and Lucas, W. J. 1992.** Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 4:915-928
- Donson, J., Kearney, C. M., Turpen, T. H., Khan, I. A., Kurath, G., Turpen, A. M., Jones, G. E., Dawson, W. O., and Lewandowski, D. J. 1993.** Broad resistance to tobamoviruses is mediated by a modified tobacco mosaic virus replicase transgene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:635-642
- Dougherty, W. G., Lindbo, J. A., Smith, H. A., Parks, T. D., Swaney, S., and Proebsting, W. M. 1994.** RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: Exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:544-552
- Ehlers, K., and Kollmann, R. 1996.** Formation of branched plasmodesmata in regenerating *Solanum nigrum*-protoplasts. *Planta* 199:126-138
- English, J. J., Mueller, E., and Baulcombe, D. C. 1996.** Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *The Plant Cell* 8:179-188
- Epel, B. L., Padgett, H. S., Heinlein, M., and Beachy, R. N. 1996.** Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP-protein fusion. *Gene* 173:75-79
- Eskandari, F., Sylvester, E. S., Richardson, J. 1979.** Evidence for lack of propagation of potato leafroll virus in its aphid vector, *Myzus persicae*. *Phytopathology* 69:45-47
- Fang, G., and Grumet, R. 1993.** Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from the zucchini yellow mosaic virus coat protein gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:358-367
- Fitchen, J. H., and Beachy, R. N. 1993.** Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annual Review of Microbiology* 47:739-763
- Frisch, D. A., Harris-Haller, L. W., Yokubaitis, N. T., Thomas, T. L., Hardin, S. H., and Hall, T. C. 1995.** Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Molecular Biology* 27:405-409

- Ghoshroy, S., Lartey, R., Sheng, J., and Citovsky, V. 1997.** Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:27-50
- Giesman-Cookmeyer, D., and Lommel, S. A. 1993.** Alanine scanning mutagenesis of a plant virus movement protein identifies three functional domains. *The Plant Cell* 5:973-982
- Gilbertson, R. L., and Lucas, W. J. 1996.** How do viruses traffic on the „vascular highway“? *Trends in plant science* 1 (8):260-268
- Golemboski, D. B., Lomonossoff, G. P., and Zaitlin, M. 1990.** Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6311-6315
- Goodwin, P. B. 1983.** Molecular size limit for movement in the symplast of the eleodea leaf. *Planta* 157:124-130
- Gough, and Murray. 1983.** Promega
- Graham, M. W., Craig, S., and Waterhouse, P. M. 1997.** Expression patterns of vascular-specific promoters RolC and Sh in transgenic potatoes and their use in engineering PLRV-resistant plants. *Plant Mol. Biol.* 33:729-735
- Graichen, K. 1991.** Zum Befall von Winterraps mit dem Westlichen Rübenvergilbungs-Virus (beet western yellows virus). *Raps* 9 Jg. (4):203-205
- Graichen, K. 1997.** Wasserrübenvergilbungsvirus Ertrags- und Qualitätsminderung beim Winterraps. *Raps* 15 Jg. (4):156-159
- Graichen, K., and Rabenstein, F. 1996.** European isolates of beet western yellows virus (BWYV) from oilseed rape (*Brassica napus* L. ssp. *napus*) are non-pathogenic on sugar beet (*Beta vulgaris* L. var. *altissima*) but represent isolates of turnip yellows virus (TuYV). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten u. Pflanzenschutz* 103 (3) 233-245
- Graichen, K., Schliephake, E., and Rabenstein, F. 1997.** Epidemischer Befall von Winterraps durch das Wasserrübenvergilbungsvirus (Syn. Westliches Rübenvergilbungsvirus) im Anbaujahr 1995/96. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 49:241-246
- Grumet, R. 1994.** Development of virus resistant plants via genetic engineering. *Plant Breeding Reviews* 112:47-79
- Hanahan, D. 1983.** *J. Mol. Biol.* 166:557
- Harr, U. 1998.** Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung des mutmaßlichen Transportproteins aus dem beet western yellows virus (BWYV). Diplomarbeit TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- Hedtke, B., Meixner, M., Gillandt, S., Richter, E. Börner, T., and Weihe, A. 1999.** Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants in vivo. *The Plant Journal* 17:557-561
- Heinlein, M., Epel, B. L., Padgett, H. S., and Beachy, R. N. 1995.** Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270:1983-1985
- Heinlein, M., Padgett, H. S., Gens, J. S., Pickard, B. G., Casper, S. J., Epel, B. L., and Beachy, R. N. 1998.** Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmatic reticulum and microtubules during infection. *The Plant Cell* 10:1107-1120
- Hemenway, C., Fang, R.-X., Kaniewski, W. K., Chua, N.-H., and Tumer, N. E. 1988.** Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO* 7:1273-1280
- Hofius, D. 1998.** Untersuchungen zum Einfluß des PLRV Movement Proteins auf den Kohlenhydratstoffwechsel in transgenen Tabakpflanzen. Diplomarbeit. Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T., and Chilton, M. D. 1986.** The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A 281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bac.* 168:1291-1301
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hofman, N. L., Eicholtz, D., Rogers, S. D., and Fraley, R. T. 1985.** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231
- Hull, R. 1989.** The movement of viruses in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:213-240

- Hull, R. and Zaitlin. 1987.** Host-RNA-dependant RNA polymerases. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:291-315
- Kahn, T. W., Lapidot, M., Heinlein, M., Reichel, C., Cooper, B., Gafny, and Beachy, R. N. 1998.** Domains of the TMV movement protein involved in subcellular localization. *The Plant Journal* 15:15-25
- Kallerhoff, J., Perez, P., Bouzoubaa, S., Ben Tahar, S., and Perret, J. 1990.** Beet necrotic yellow vein virus coat protein-mediated protection in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. *Plant Cell Rep.* 9:224-228
- Kamer, P., and Argos, P. 1984.** Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* 12:7269-7282
- Kaniewski, W., Lawson, C., Loveless, J., Thomas, P., Mowry, T., Reed, G., Mitsky, T., Zalewski, J., and Muskopf, Y. 1994.** Expression of potato leafroll virus replicase genes in Russet Burbank potatoes provide field immunity to PLRV. Abstract P1-32 of the Thirteenth Annual Meeting of the American Society for Virology, Madison, WI, July 1994, p. 107
- Kawchuk, L. M., Martin, R. R., and McPherson, J. 1990.** Resistance in transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 3:301-307
- Kawchuk, L. M., Martin, R. R., and McPherson, J. 1991.** Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 4:247-253
- Kempers, R., Prior, D. A. M., Van Bel, A. J. E., and Oparka, K. J. 1993.** Plasmodesmata between sieve element and companion cell of extrafascicular stem phloem of *Cucurbita maxima* permit passage of 3 kDa fluorescent probes. *Plant Journal* 4:567-575
- Koev, G., Mohan, B. R., Beckett, R., and Miller, A. 1996.** Transgenic resistance to barley yellow dwarf virus: replication, recombination, and risks. <http://nbiap.biochem.vt.edu/brarg/brasym96/koev96.htm>
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D., and Zakour, R. A. 1987.** *Methods Enzymol.* 154:367
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Landsmann, J., Llewellyn, D., Dennis, E. S., and Peacock, W. J. 1988.** Organ regulated expression of the *Parasponia andersonii* haemoglobin gene in transgenic tobacco plants. *Mol. General Genetic* 214:68-73
- Lapidot, M., Gafny, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W. J., and Beachy, R. N. 1993.** A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant Journal* 4:959-970
- Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P., and Tumer, N. E. 1990.** Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *BioTechnology* 8:127-134
- Lerchl, J., Geigenberger, P., Stitt, M., and Sonnewald, U. 1995.** Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *The Plant Cell* 7:259-270
- Lindbo, J. A., and Dougherty, W. G. 1992.** Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 5:144-153
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., and Dougherty, W. G. 1993b.** Pathogen derived resistance to potyviruses: Working but why? *Semin. Virol.* 4:369-379
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., and Dougherty, W. G. 1993a.** Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *The Plant Cell* 5:1749-1759

- Loesch-Fries, L., Merlo, D., Zinnen, T., Burhop, L., Hill, K., Krahn, K., Jarvis, N., Nelson, S., and Halk, E. 1987.** Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO* 6:1845-1851
- Longstaff, M., Brigneti, G., Boccard, F., Chapman, S., and Baulcombe, D. 1993.** Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO* 12:379-386
- Lucas, W. J., and Gilbertson, R. L. 1994.** Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:387-411
- Lucas, W. J., and Wolf, S. 1993.** Plasmodesmata: the intercellular organelle of green plants. *Trends Cell Biol.* 3:308-315
- Lucas, W. J., Bouche-Pillon, S., Jackson, D. P., Nguyen, L., Baker, L. et al., 1995.** Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* 270:1980-1983
- Lucas, W. J., Ding, B., and van der Schoot, C. 1993.** Plasmodesmata and supracellular nature of plants. *New Phytol.* 125:435-476
- Lühs, W., and Friedt, W. 1997.** Wann ist mit ersten transgenen Rapsorten in Deutschland zu rechnen? *Raps Fachzeitschrift über Öl- und Eiweißpflanzen* 15 1:10-17
- Lütgering, A. 1997.** Untersuchung zum Einsatz des GFP in der pflanzlichen Molekularbiologie. Diplomarbeit TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- MacFarlane, S. A., Davies, J. W. 1992.** Plant transformed with a region of the 201-kilodalton replicase gene from pea early browning virus RNA 1 are resistant to virus infection. *Proc Nat. Acad. Sci USA* 89:5829-5833
- Martin, R. R., Keese, P. K., Young, J. M., Waterhouse P. M., and Gerlach W. L. 1990.** Evolution and molecular biology of luteoviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:341-361
- Maule, A. J. 1991.** Virus movement in infected plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:457-473
- Mayo, M. A., and Ziegler-Graff, V. 1996.** Molecular biology of Luteoviruses. *Advances in Virus Research* 46:413-465
- McLean, B. G., Zupan, J., and Zambryski, P.C. 1995.** Tobacco mosaic virus movement protein associates with cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* 7:2101-2114
- Mezitt, L. A., and Lucas, W. J. 1996.** Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *Plant Mol. Biology* 32:251-273
- Miller, W. A., and Rasochová, L. 1997.** Barley yellow dwarf viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:167-190
- Miller, W. A., Dinesh-Kumar, S. P., and Paul, C. P. 1995.** Luteovirus gene expression. *Critical Reviews in Plants Sciences*, 14 (3):179-211
- Monzer, J. 1991.** Ultrastructure of secondary plasmodesmata formation in regenerating *Solanum nigrum*-protoplast cultures. *Protoplasma* 165:86-95
- Moore, P. J., Fenczik, C. A., and Beachy, R. N. 1992.** Developmental changes in plasmodesmata in transgenic plants expressing the movement protein of tobacco mosaic virus. *Protoplasma* 170:115-127
- Mueller, E., Gilbert, J., Davenport, G., Brigneti, G., and Baulcombe, D. C. 1995.** Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant Journal* 7:1001-1013
- Mushegian, A. R., and Koonin, E. V. 1993.** Cell-to-cell movement of plant-viruses – insights from amino-acid-sequence comparison of movement proteins and from analogies with cellular-transport systems. *Archives of Virology* 133:239-257
- Mutterer, J. D., Stussi-Garaud, C., Michler, P., Richards, K. E., Jonard, G., and Ziegler-Graff, V. 1999.** Role of the beet western yellows virus readthrough protein in virus movement in *Nicotiana clevelandii*. *J. of Gen. Virology* 80:2771-2778
- Nagel, R., Elliot, A., Masel, A., Birch, R. G., and Manners, J. M. 1990.** Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiology Letters* 67:325-328
- Nelson, R. S., Powell-Abel, P., and Beachy, R. N. 1987.** Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. *Virology* 158:126-132

- Nelson, R. S., McCormick S. M., Delannay, X., Dubé, P., Layton, J., Anderson, E. J., Kaniewski, M., Proksch, R. K., Horsch, R. B., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. 1988.** Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Bio/Technology* 6:403-409
- Niesbach-Klösigen, U., Guilley, H., Jonard, G., and Richards, K. 1990.** Immunodetection in vivo of beet necrotic yellow vein virus-encoded proteins. *Virology* 178:52-61
- Oparka, K. J., Boevink, P., and Santa Cruz, S. 1996.** Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends Plant Sci.* 1:412-418
- Oparka, K. J., Prior, D. A., Santa Cruz, S., Padgett, H. S., and Beachy, R. N. 1997.** Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *The Plant Journal* 12:781-789.
- Padgett, H. S., Epel, B. L., Kahn, T. W., Heinlein, M., Watanabe, Y., and Beachy, R. N. 1996.** Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implication for cell-to-cell spread of infection. *The Plant Journal* 10:1079-1088
- Powell, P. A., Sanders, P. R., Tumer, N., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. 1990.** Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* 175:124-130
- Powell, P. A., Stark, D. M., Sanders, P. R., and Beachy, R. N. 1989.** Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6949-6952
- Powell-Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. 1986.** Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743
- Prasher, D., Eckenrode, V., Ward, W., Prendergast, F., and Cormier, M. 1992.** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233
- Prill, B., Maiss, E., Chansilpa, N., and Casper, R. 1988.** Molecular cloning of single-stranded RNAs of potato leafroll virus and beet western yellows virus. *Journal of Gen. Virol.* 69:2397-2402
- Prins, M., and Goldbach, R. 1996.** RNA-mediated virus resistance in transgenic plants. *Arch. of Virol.* 141:2259-2276
- Prüfer, D., Kawchuk, L., Monecke, M., Nowok, S., Fischer, R., and Rohde, W. 1999.** Immunological analysis of potato leafroll luteovirus (PLRV) P1 expression identifies a 25 kDa RNA-binding protein derived via P1 processing. *Nucleic Acids Research* 27(2):421-425
- Read, M. A., and Hewson, R. T. 1988.** Prevention of beet western yellows virus (BWYV) in winter oilseed rape by control of aphid vectors with deltamethrin. *Proc. Crop Prot. Conf. – Pest and Disease*, 989-997
- Register, J. C. III, and Nelson, R. 1992.** Early events in plants virus infection: relationships with genetically engineered protection and host gene resistance. *Seminars in Virology* 3:441-451
- Register, J. C. III, Powell, P. A., and Beachy, R. N. 1989.** Genetically engineered cross protection against TMV interferes with initial infection and long distance spread of the virus. In: *Molecular biology of plant-pathogen interactions*. Staskawicz, B., Ahlquist, P., Yoder, O. (eds.) Alan R. Liss, NY, 269-281
- Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B., and Maas, C. 1996.** Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5888-5893
- Reichel, C., and Beachy, R. N. 1998.** Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11169-11174
- Rochow, W. F., and Duffus, J. E. 1981.** In Kurstak, E (ed.), *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*, Elsevier/North-Holland, 147-170



- Sambrook, J., Fritsch, E. P., and Maniatis, T. 1989.** Molecular Cloning (second edition): A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1 - 3
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977.** DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 74:5463-5467
- Schiemann, J., Laucke, G., Graichen, K., Maiß, E., und Casper, R. 1998.** Das Westliche Rübenvergilbungsvirus beim Winterraps - Nachweis, Epidemiologie, Klonierung sowie Ansätze zur züchterischen und gentechnischen Erzeugung von Virusresistenz. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 100 Jahre Pflanzenschutzforschung*, Heft 340, Parey Buchverlag Berlin, Seite 35-61
- Schmitz, J. 1995.** Molekularbiologische Studien am vermuteten Transportprotein des potato leafroll virus (PLRV). Untersuchungen zur Lokalisation und alternativen Expression von pr17. Dissertation Universität Köln
- Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, D., Rohde, W., and Rohfritsch, O. 1997.** In situ localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* 235:311-322
- Schröder, M. 1991.** Schädigen Viren nun auch den Raps? *DLG-Mitteilungen/agrar-inform* 8:57-58
- Schröder, M. 1994.** Untersuchungen zur Anfälligkeit des Rapses (*Brassica napus* L., ssp. *napus*) gegenüber verschiedenen Viruskrankheiten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101:576-589
- Smith, H. A., Swaney, S. L., Parks, T. D., Wernsman, E. A., and Dougherty, W. G. 1994.** Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *The Plant Cell* 6:1441-1453
- Smith, H. G., and Hinckes, J. A. 1985.** Studies on beet western yellows virus in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) and sugar beet (*Beta vulgaris*). *Ann. appl. Biol.* 107:473-484
- Sokolova, M. A., Pugin, M. M., Shugla, O. A., and Skryabin, K. G. 1995.** Construction of transgenic potato plants resistance to potato virus Y. *Molecular Biology* 28:646-649
- Sokolova, M. A., Prüfer, D., Tacke, E., and Rohde, W. 1996.** The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS* 400:201-205
- Southern, E. M. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517
- Tacke, E., Kull, B., Prüfer, D., Reinold, S., Schmitz, J., Salamini, F., and Rohde W. 1995.** PLRV gene expression in potato. *Biotechnology and Plant Protection (Viral Pathogenesis & Disease Resistance) Proceedings of the Fifth International Symposium*
- Tacke, E., Prüfer, D., Schmitz, J., and Rohde, W. 1991.** The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J. Gen. Virol.* 72:2035-2038
- Tacke, E., Schmitz, J., Prüfer, D., and Rohde, W. 1993.** Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic  $\alpha$ -helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* 197:274-282
- Tacke, E., Salamini, F., and Rohde, W. 1996.** Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. *Nature Biotech.* 14:1597-1601
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., and Steinbiss, H. 1987.** A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Research*. 15:5890
- Tumer, N. E., O'Connel, K. M., Nelson, R. S., Sanders, P. R., Beachy, R. N., Fraley, R. T., and Shah, D. M. 1987.** Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO* 6:1181-1188
- Van Bel, A. J. E., Kempers, R., Ammerlaan, A., van Rijen, H. V. M., van Amerongen, J. K., Kelling, F., Knoblauch, M., Prior, D. A. M., and Oparka, K. J. 1996.** Molecular

- exclusion limits, symplasmic (dis)continuity and physiological domains in transport phloem. Third International Workshop on basic and Applied Research in Plasmodesmal Biology. Zichron-Yakov, Israel, pp. 129-131
- Van der Wilk, F. 1995.** Potato Leafroll Virus, molecular analysis and genetically engineered resistance. Thesis Wageningen ISBN 90-5485-461-8
- Van der Wilk, F., Houterman, P., Molthoff, J., Hans, F., Dekker, B., Van den Heuvel, J. F. J. M., Huttinga, H., and Goldbach, R. 1997a.** Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:153-159
- Van der Wilk, F., Verbeek, M., Dullemans, A. M., and Van den Heuvel, J. F. J. M. 1997b.** The genome-linked protein of potato leafroll virus is located downstream of the putative protease domain of the ORF1 product. *Virology* 234:300-303
- Van der Wilk, F., Willink, D., Huismann, M., Huttinga, H., and Goldbach, R. 1991.** Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral infection. *Plant Molecular Biology* 17:431-439
- Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. 1988.** Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. *Nucleic Acids Res.* 16:9917-9932
- Vieira, J., and Messing, J. 1982.** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-261
- Walsh, J. A., Perrin, R. M., Miller, A., and Laycock, D. 1989.** Studies on beet western yellows virus in winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) and the effect of insecticidal treatments on its spread. *Crop Protection* 8:137-143
- Waterhouse, P., Smith, N., and Wang, M.-B. 1999.** Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends in Plants Science* Nov. 4 (11):452-457
- Wertman, K., Drubin, D., and Botstein, D. 1992.** Systemic mutational analysis of the yeast ACT1 gene. *Genetics* 132:337-350
- Wilson, T. M. A. 1993.** Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3134-3141
- Young, M. J., Kelly, L., Larkin, P. J., Waterhouse, P. M., and Gerlach, W. L. 1991.** Infectious in vitro transcripts from a cloned cDNA of barley yellow dwarf virus. *Virology* 180:372-379
- Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, J. D., Simonis, M.-T., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K. E., and Jonard, G. 1996.** The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 9:501-510



## 9.2 Sequenz der Expressionskassette CP-VPg

### CP-VPg

```

1   AAGCTTGCAT GCCTGCAGGT CAACATGGTG GAGCACGACA CTCTCGTCTA CTCCAAGAAT 60
62  ATCAAAGATA CAGTCTCAGA AGACCAAAGG GCTATTGAGA CTTTTCAACA AAGGGTAATA 120
122 TCGGGAAACC TCCTCGGATT CCATTGCCCA GCTATCTGTC ACTTGATCAA AAGGACAGTA 180
182 GAAAAGGAAG GTGGCACCTA CAAATGCCAT CATTGCGATA AAGGAAAGGC TATCGTTCAA 240
242 GAATGCCTCT GCCGACAGTG GTCCCAAAGA TGGACCCCCA CCCACGAGGA GCATCGTGGA 300
302 AAAAGAAGAC GTTCCAACCA CGTCTTCAAA GCAAGTGGAT TGATGTGATA TCTCCACTGA 360
362 CGTAAGGGAT GACGCACAAT CCCACTATCC TTCGCAAGAC CCTTCCTCTA TATAAGGAAG 420
422 TTCATTTTCAT TTGGAGAGGA CCTCGAGAAT TCGACGTCGG TACCCACGAA CGATGCCGTT 480
    > CP-Start                                zerstörter 19,5k-Start
482 AATGAATACG GTCGTGGGTA GGAGAACAAT CAACGGCCGA AGACGACCAC GGAGGCAAAC 540
    eingefügte Stops
542 ACGACGCGCT CAGCGCTCTC AGCCAGTAGT TGTAGTCCAA ACCTCTCGGG CAACACAACG 600
602 CCGACCTAGA CGACGACGAA GAGGTAACAA CCGGACAGGA AGAACTGTTC CTACCAGAGG 660
662 AGCAGGTTCG AGCGAGACAT TTGTTTTTCTC AAAAGACAAT CTCGCGGGAA GTTCCAGCGG 720
722 AGCAATCACG TTCGGGCCGA GTCTATCAGA CTGCCCCGCA TTCTCTAATG GAATGCTCAA 780
782 GGCCTACCAT GAGTATAAAA TCTCAATGGT CATTTTGGAG TTCGTCTCCG AAGCCTCTTC 840
842 CCAAAATTCC GGTTCATCG CTTACGAGCT GGACCCACAC TGTAAACTCA ACTCCCTTTC 900
902 CTCAACTATC AACAAGTTCG GGATCACAAA GCCCGGGAAA AGGGCGTTTA CAGCGTCTTA 960
962 CATCAACGGA ACGGAATGGC ACGACGTTGC CGAGGACCAA TTCAGGATCC TCTACAAAGG 1020
1021 CAATGGTTCT TCATCGATAG CTGGTTCTTT CAGAATCACC ATTAAGTGTC AATTCCACAA 1140
    └─
1081 CCCCAAATAG GGGGATCCTC TAGAGTCCGC GCAAAAATCA CCAGTCTCTC TCTACAAATC 1140
1141 TATCTCTCTC TATTTTTTCTC CAGAATAATG TGTGAGTAGT TCCCAGATAA GGGAATTAGG 1200
1201 GTTCTTATAG GGTTCGCTC ATGTGTTGAG CATATAAGAA ACCCTTAGTA TGTATTTGTA 1260
1261 TTTGTAAAT ACTTCTATCA ATAAAATTTC TAATTCCTAA AACCAAAATC CAGTGACCTG 1320
1321 CAGGCAAGCT T

```

HindIII-Fragment CP-VPg  
35S-Promoter und pA aus CaMV

## NLATCP

HindIII-Fragment NLATCP  
35S-Promoter und pA aus CaMV

#### 9.4 Sequenz der Expressionskassette 19,5k-Gen

##### 19,5k-Gen

```

1   AGCTTGCATG CCTGCAGGTC AACATGGTGG AGCACGACAC TCTCGTCTAC TCCAAGAATA 60
61  TCAAAGATAC AGTCTCAGAA GACCAAAGGG CTATTGAGAC TTTTCAACAA AGGGTAATAT 120
121 CGGGAAACCT CCTCGGATTC CATTGCCCAG CTATCTGTCA CTTGATCAAA AGGACAGTAG 180
181 AAAAGGAAGG TGGCACCTAC AAATGCCATC ATTGCGATAA AGGAAAGGCT ATCGTTCAAG 240
241 AATGCCTCTG CCGACAGTGG TCCCAAAGAT GGACCCCCAC CCACGAGGAG CATCGTGGA 300
301 AAAGAAGACG TTCCAACCAC GTCTTCAAAG CAAGTGGATT GATGTGATAA CATGGTGGAG 360
361 CACGACACTC TCGTCTACTC CAAGAATATC AAAGATACAG TCTCAGAAGA CCAAAGGGCT 420
421 ATTGAGACTT TTCAACAAAG GGTAATATCG GGAAACCTCC TCGGATTCCA TTGCCAGCT 480
481 ATCTGTCACT TGATCAAAAG GACAGTAGAA AAGGAAGGTG GCACCTACAA ATGCCATCAT 540
541 TCGGATAAAG GAAAGGCTAT CGTTCAAGAA TGCCTCTGCC GACAGTGGTC CCAAAGATGG 600
601 ACCCCACCC ACGAGGAGCA TCGTGGAAAA AGAAGACGTT CCAACCACGT CTTCAAAGCA 660
661 AGTGGATTGA TGTGATATCT CCACTGACGT AAGGGATGAC GCACAATCCC ACTATCCTTC 720
721 GCAAGACCCT TCCTCTATAT AAGGAAGTTC ATTTCAATTTG GAGAGGAAAA TATAAAACT 780
      > PPV-Leader-Sequenz
781 CAACACAACA TACAAAATTT TATGCAATCA AATCAATCTC AAGCTATCAA AATTTTTCGA 840
841 ATCTCACTTG AAAGATCAAA AATCAACAAA GAAATTCCT TAATTTCTTT ACTAAATTTA 900
      > > 19,5k-Start
901 CTGCAAGTCA AGATGTCCAT GGAAGAAGAC GACCACGCAG GCAAACACGA CGCGCTCAGC 960
961 GCCCTCAGCC AGTGGTTGTG GTCCAAACCT CTCGGGCAAC ACAACGCCGA CCTAGACGAC 1020
1021 GACGAAGAGG TAACAACCGG ACAGGAAGAA CTGTTCTCTAC CAGAGGAGCA GGTTTCGAGCG 1080
1081 AGACATTTGT TTTCTCAAAA GACAATCTCG CGGGAAGTTC CAGCGGAGCA ATCACGTTTCG 1140
1141 GGCCGAGTCT ATCAGACTGC CCGGCATTCT CTAATGGAAT GCTCAAGGCC TACCATGAGT 1200
1201 ATAAAATCTC AATGGTCATT TTGGAGTTCG TCTCCGAAGC CTCTTCCCAA AATTCGGTT 1260
1261 CCATCGCTTA CGAGCTGGAC CCACACTGTA AACTCAACTC CCTTTCCTCA ACTATCAACA 1320
1321 AGTTCGGGAT CACAAAGCCC GGGAAAAGGG CGTTTACAGC GTCTTACATC AACGGAACGG 1380
1381 AATGGCACGA CGTTGCCGAG GACCAATTCA GGATCCTCTA CAAAGGCAAT GGTTCCTTCAT 1440
      ┌
1441 CGATAGTCGA CTCTAGACTA GAGTCCGCAA AAATCACCAG TCTCTCTCTA CAAATCTATC 1500
1501 TCTCTCTATT TTTCTCCAGA ATAATGTGTG AGTAGTTCCC AGATAAGGGA ATTAGGGTTC 1560
Fortsetzung nächste Seite ....

```

```
1561 TTATAGGGTT TCGCTCATGT GTTGAGCATA TAAGAAACCC TTAGTATGTA TTTGTATTTG 1620
1621 TAAAATACTT CTATCAATAA AATTTCTAAT TCCTAAAACC AAAATCCAGT GACCTGCAGG 1680
1681 CATGCAAGCT T
```

HindIII 19,5k-Gen

Enhanced 35S Promoter, Translationsverstärker (Leader aus PPV) und pA aus CaMV

## 10 Danksagung

Den Herren Professoren Dr. R. Casper und Dr. G. Deml danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Pflanzenvirologie, biologische Sicherheit und Mikrobiologie (ehemals Biochemie und Pflanzenvirologie) der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. J. Schiemann dafür danken, daß er mir das Thema dieser Arbeit zur weitgehend selbständiger Bearbeitung überlassen hat und mir in zahlreichen Diskussionen beratend zur Seite stand.

Prof. Dr. E. Maiß und Herrn Dr. E. Tacke bin ich zu großem Dank verpflichtet. Sie halfen mir durch die Weitergabe ihres großen Wissens in der Molekularbiologie der Pflanzenviren sowie ihrer ständigen Diskussionsbereitschaft aber auch mit zahlreichen Tricks und Tips. Sie sollen mir in meinem weiteren Lebenslauf stets ein Vorbild sein.

Einen tiefen Dank spreche ich den Herren Dr. K. Graichen und Dr. F. Rabenstein aus. Sie halfen mir bei Einarbeitung in die Virologie des BWYV.

Den Herren Dr. W. Burgermeister und Dr. L. Fecker danke für die methodische Unterstützung; weiter halfen mir die Pflanzenvirologen Dr. Huth, Dr. Weidemann und Dr. Lesemann.

Bei den „Heloten“ (AG Dr. Schiemann), G. Jüttner, M. Röver, A. Weber, A. Matzk, A. Mahn, und allen anderen möchte ich mich für die fachliche Zusammenarbeit und Hilfe bedanken. Daneben möchte ich allen meinen Diplomanden, Frau A. Gräfin zu Münster, Herrn A. Lütgering, Frau U. Harr, Herrn J. Lay und Herrn D. Ohlrogge, danken für ihre Hilfe bei den vielen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Allen Mitarbeitern des Instituts sei für die gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima gedankt. Ich möchte nur einige besonders nennen: Herr Dr. H. Heuer, Frau A. Schönwälder, Frau Dr. L. Katul.

Für die Diskussionsbereitschaft zum Thema plant virus movement protein möchte ich allen russischen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Atabekov, allen voran Herrn Dr. S. Morozov, herzlich danken.

Herr Dr. M. Rohde (GBF, Braunschweig) half mir bei den konfokalen Laserscanning Aufnahmen.

Einen herzlichen Dank für die gute Zusammenarbeit und die heiteren Stunden in trüben Labortagen sage ich Frau D. Isensee und Herrn A. Lütgering.

Ein sehr großer Dank gilt meiner Ehefrau Uta Dieterich und ihren Eltern, die mir jederzeit hilfreich besonders in schwierigen finanziellen Lagen zu Seite standen.

Schließlich danke ich der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung (GFP) und dem BML für die finanzielle Unterstützung.



## Lebenslauf

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Name                | Guido Dieterich geb. Laucke                                                                                                                                                                                                                             |
| Geburtsdatum        | 23.05.1966                                                                                                                                                                                                                                              |
| Geburtsort          | Wolfenbüttel                                                                                                                                                                                                                                            |
| Staatsangehörigkeit | deutsch                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Familienstand:      | verheiratet, ein Kind                                                                                                                                                                                                                                   |
| 1972-1976           | Grundschule Faßberg                                                                                                                                                                                                                                     |
| 1976-1982           | Christian-Realschule Hermannsburg                                                                                                                                                                                                                       |
| 1982-1985           | Christian-Gymnasium Hermannsburg                                                                                                                                                                                                                        |
| 1985                | Abitur                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 1985-1987           | Wehrdienst,<br>Ausbildung zum Reserveoffizier (SaZ 2)                                                                                                                                                                                                   |
| 1987-1992           | Studium der Biologie an der Technischen Universität<br>Braunschweig mit dem Schwerpunkt Genetik                                                                                                                                                         |
| 1991-1992           | Diplomarbeit bei Herrn Dr. R. Hehl am Institut für<br>Genetik; Arbeitsgruppe „Molekulare Genetik“ (TU<br>BS) mit dem Thema: „Untersuchung zur<br>differentiellen Gentranskription in N- und n-<br>Genotypen von Tabak“.                                 |
| seit 1992           | wissenschaftlicher Angestellter am Institut für<br>Biochemie und Pflanzenvirologie (jetzt Institut für<br>Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und Biologische<br>Sicherheit) der Biologischen Bundesanstalt für Land-<br>und Forstwirtschaft, Braunschweig |
| 1997                | Mitarbeit am Projekt „Einlagerung von<br>Resistenzgenen gegen das Westliche<br>Rübenvergilbungsvirus in Raps mit verschiedenen<br>gentechnischen Ansätzen“                                                                                              |

Braunschweig, den 08. Mai 2000